



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Über die Epimerisierung spirocyclischer GABA-Analoga“

Verfasserin

Andrea Haumer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Ernst Urban

Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. Ernst Urban für die kompetente Betreuung während meiner ganzen Diplom arbeitszeit und besonders für seine Hilfe bei der Interpretation der gemessenen ^1H -NMR und der ^{13}C -NMR Spektren danken.

Auch dem weiteren Team der quantitativen Abteilung möchte ich besonders für die stets bereitwillige und sehr wertvolle Hilfestellung danken.

Ein spezieller Dank gilt meinen Arbeitskollegen Franziska Missliwetz und Mohamed El-Gamal, ohne jene die Diplomarbeitszeit im Labor nur halb so erfreulich gewesen wäre.

Besonders danke ich meinen Eltern Josef und Maria Haumer, welche mir durch ihre finanzielle Unterstützung mein Studium erst ermöglicht haben. Bei meinen Geschwistern Christian, Petra und Bernhard möchte ich mich ebenfalls für ihre stetige Unterstützung bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich allen Kollegen danken, die während meines Studium zu guten Freunden wurden und auf deren Unterstützung ich ebenfalls jederzeit zählen konnte.

Inhaltsverzeichnis:

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Grundlagen des GABA-Systems	1
2. GABA-Transporter und die Entwicklung selektiver Inhibitoren	4
3. GABA-Transporter-Subtypen	6
3.1. Lokalisierung der Subtypen	7
3.2. Pharmakologische Testung der GABA-Transporter-Subtypen	9
4. Spirocyclische GABA-Analoga als GABA-uptake-Hemmer	12

Themenstellung 15

Hauptteil 16

1. Synthese von (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat	16
2. Bisherige Versuche zur Trennung von diastereomeren spirocyclischen GABA-Analoga	18
3. Stabilitätsprüfung von den Salzen der spirocyclischen Aminosäureester	19
4. Strukturaufklärung der spirocyclischen Aminosäureester durch Kernresonanzspektroskopie	20
5. Überführung der Salze der spirocyclischen Aminosäureester in die freie Base	24
6. Epimerisierung durch Enolisierung und anschließende Reprotonierung des Enolates	24
6.1. Epimerisierungsversuche mit Triphenylmethyl-Lithium	25
6.2. Epimerisierungsversuche mit LDA	25
6.2.1. Epimerisierung 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat 1d	26
6.2.2. Epimerisierung 2-Azaspiro[5.5]undecan-7-carboxylat 2d	28
6.3. Epimerisierung mit Lithium- Hexamethyldisilazan	28
7. Vergleichende spektroskopische Analyse der spirocyclischen Aminosäureester 1d und 7d	29
8. Trennung epimerer spirocyclischer Aminosäureester	32
9. Herstellung des Oxalatsalzes der Zielverbindung 7d	33
Zusammenfassung	34

Experimenteller Teil 35

Epimerisierung von 2dOX mit LDA	36
Versuch zur präparativen Trennung von 2d und 8d mittels Flash-Chromatographie	37
Epimerisierung von 1dOX mit LDA	38
Freisetzung der Base (5RS,6RS)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl-2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (1d)	40
Epimerisierung von 1d mit LDA	41
Präparative Trennung der Diastereomeren 1d und 7d mittels Flash-Chromatographie	42
Herstellung des Oxalates 7dOX	44

Literaturverzeichnis 45

Anhang NMR-Spektren

Lebenslauf

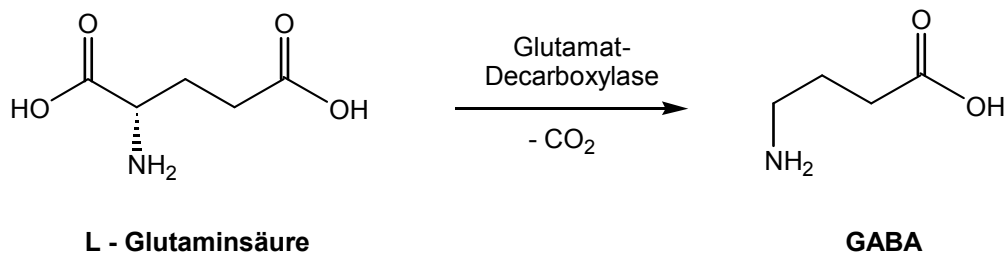
Einleitung [1-25]

1. Grundlagen des GABA-Systems [11,12,16-20]

Im zentralen Nervensystem herrscht ein ständiges Arrangement zwischen erregenden und hemmenden Einflüssen einer Nervenzelle auf die anderen. Den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter stellt nach heutigem Wissensstand γ -Aminobuttersäure, kurz GABA genannt, dar [17]. GABA bildet dabei den direkten Gegenspieler zu Glutamat, dem bedeutungsvollsten exzitatorischen Botenstoff. Eine übermäßig gesteigerte Erregung der Neuronen im ZNS kann also nicht nur durch eine Erhöhung der exzitatorischen Neurotransmission erklärt werden, sondern könnte wahrscheinlich ebenfalls eine Folge von Defiziten im inhibitorischen System sein. Die bei Patienten mit schwerer Epilepsie nachgewiesenen reduzierten GABA-Spiegeln bestärken diese Theorie. Besonders im limbischen System, das in Verbindung mit Sedierung und Anxiolyse gebracht wird, übernimmt der Botenstoff regulatorische Aufgaben. Weiters soll der Neurotransmitter GABA für die Schlafregulation von Bedeutung sein. Die Funktion von GABA ist beim Wechsel vom Wachzustand zum Schlaf zu erkennen. GABA-Neuronen beginnen im Thalamus den Zugang von Signalen zu hemmen, die im Wachzustand normalerweise den zerebralen Cortex erreichen. Naheliegend ist somit die Hoffnung, neurologische Störungen wie Epilepsie, Angststörungen und Schlafstörungen durch Beheben von reduzierten GABA-Spiegeln lindern zu können [18,19].

Mit der Einführung der Benzodiazepine wurde bereits eine wichtige Arzneistoffgruppe entdeckt, die anxiolytische, sedierende, hypnotische und antikonvulsive Wirkungen durch einen allosterischen Angriff am GABA_A-Rezeptor entfaltet. Die Bindung der Benzodiazepine am GABA_A-Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, sodass eine erhöhte Sensibilität gegenüber GABA resultiert. Die Wirksamkeit des inhibitorischen Neurotransmitters wird somit verstärkt [17,19].

Man nimmt an, dass GABA etwa bei 60-75% der Gehirnsynapsen beteiligt ist. Die meisten GABAergen Neurone sind inhibitorische Interneurone, die das Hirnareal ihres Zellkörpers nicht verlassen und andere nahegelegene Nervenzellen innervieren. Es gibt jedoch auch GABA-Projektionsneurone [19].



GABA wird unter Katalyse der Glutamat-Decarboxylase (=GAD) aus Glutamat synthetisiert. Das zytoplasmatische Enzym GAD, das von seinem Cofaktor Pyridoxyl-5-Phosphat (PALP) abhängig ist, existiert in zwei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (65 beziehungsweise 67kDa). Während GAD67 am Neuron relativ gleichmäßig verteilt ist und vorwiegend in der aktiven Form vorliegt, findet man GAD65 hauptsächlich am Nervenende nahe dem synaptischen Spalt als inaktives Apoenzym, welches erst bei neuronalem Impuls aktiviert wird [16]. Nach seiner Synthese wird GABA durch einen vesikulären GABA-Transporter in Speichervesikel eingeschleust und erst infolge eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt. Die vesikuläre Freisetzung wird durch den bei einem Aktionspotential auftretenden Calcium-Einstrom gesteuert. Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass der Botenstoff GABA auch durch eine nicht-vesikuläre Freisetzung in den synaptischen Spalt gelangen kann. Dies geschieht durch die Umkehr des membranären GABA-Transportsystems [16,21]. Die Verschiebung des Natrium-Gradienten zwischen intrazellulären und extrazellulären Bereich kann dazu führen, dass der elektrogene GABA-Transporter den Botenstoff aus dem Neuron freisetzt anstatt ihn aus dem synaptischen Spalt zu entfernen.

Um seine Wirkung entfalten zu können, bindet GABA an seine Rezeptoren, wobei heutzutage 3 große Rezeptorfamilien unterschieden werden: GABA_A, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren. Diese können ihrerseits wieder in zahlreiche Subtypen unterteilt werden. GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sich vor allem auf der Membran des postsynaptischen Neurons befinden. Bindung von GABA öffnet den Kanal für Chlorid, es kommt zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer verminderten Erregbarkeit des postsynaptischen Neurons. Bei GABA_B-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sowohl auf präsynaptischen als auch postsynaptischen Neuronen vorkommen. Bei Aktivierung eines metabotropen GABA_B-Rezeptors wird die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalium-Kanälen erhöht und in der Folge jene von Calcium-Kanälen vermindert [20].

Um die synaptische Wirkung von GABA zu beenden, wird der Neurotransmitter wieder in präsynaptische Nervenendigungen oder umliegende Gliazellen mittels membranständiger GABA-Transporter aufgenommen. Im präsynaptischen Neuron kann der Neurotransmitter

GABA aus dem Zytoplasma wieder in die Vesikel befördert und somit gespeichert werden. In den Gliazellen erfolgt jedoch ein Abbau durch die GABA-Transaminase. GABA wird in die Mitochondrien befördert und dort zu Succinatsemialdehyd metabolisiert. Dabei übernimmt das aus dem Citrat-Cyclus stammende α -Ketoglutarat die Aminogruppe, sodass aus α -Ketoglutarat Glutamat entsteht. Das durch die Transaminierung entstandene Succinatsemialdehyd wird zu Succinat oxidiert und in den Zitronencyclus eingeschleust. Das entstandene Glutamat wird im Cytosol zu Glutamin umgewandelt und kann von der Gliazelle in das Neuron zurücktransportiert werden, wo es neuerlich nach Umwandlung zu Glutamat für die Glutamat-Decarboxylase zur Verfügung steht. Dabei spricht man vom sogenannten „GABA-Shunt“ [11,12].

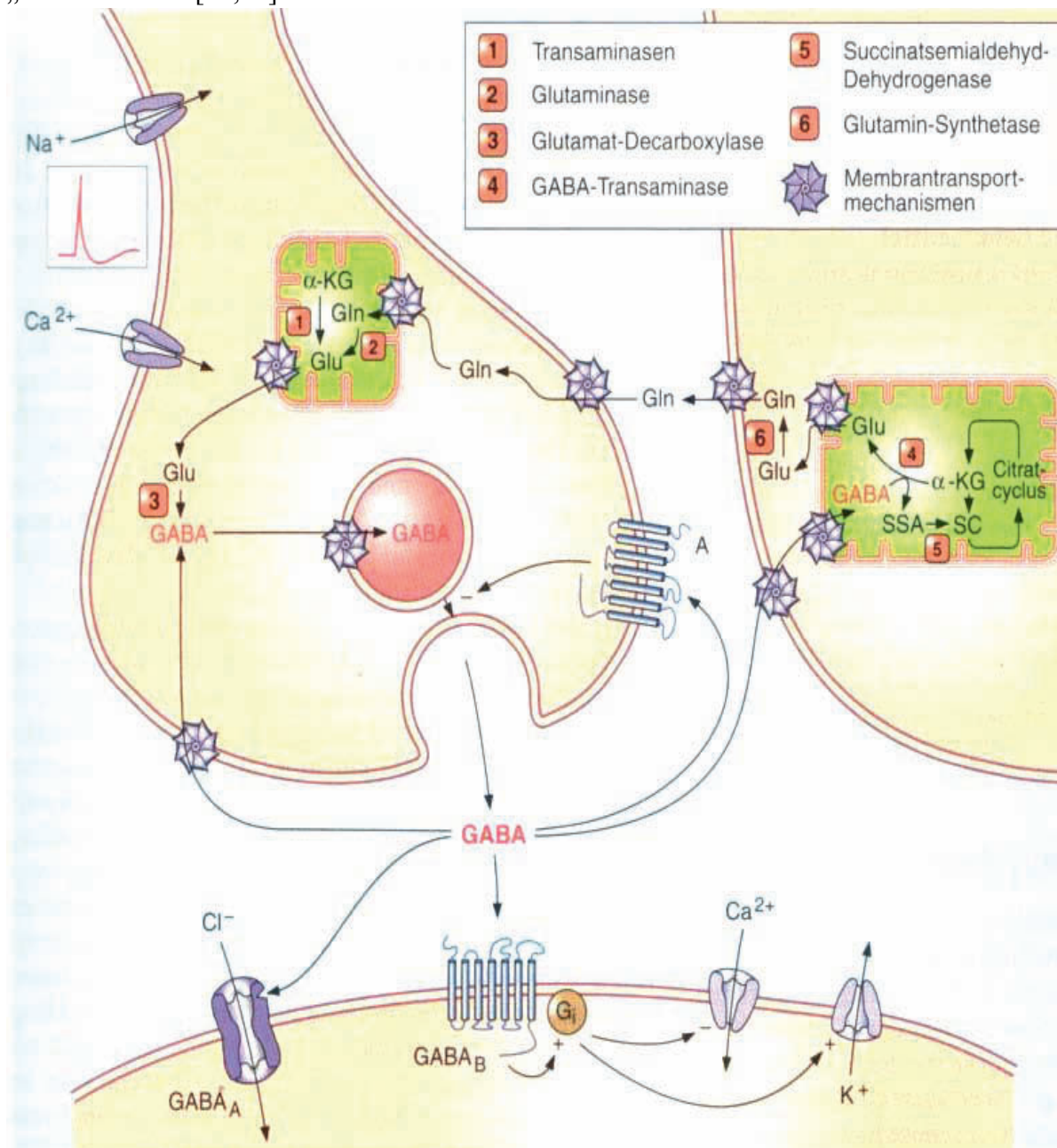


Abbildung 1: Synapse mit dem Neurotransmitter GABA [11]

2. GABA-Transporter und die Entwicklung selektiver Inhibitoren [12,14]

Als 1968 von Iversen and Neal Transporter für den Botenstoff GABA sowohl in neuronalen als auch glialen Zellmembranen nachgewiesen wurden, war dies für die Forschung nach der Regulation der inhibitorischen Neurotransmission von großer Bedeutung.

In der Erwartung die Verweildauer des Botenstoffes GABA im synaptischen Spalt verlängern zu können, begab man sich auf die Suche nach selektiven Inhibitoren dieser GABA-Transporter. Dadurch erhoffte man sich, die inhibitorische Wirkung von GABA im Zentralnervensystem zu verstärken und somit neurologische Störungen mit Defiziten im inhibitorischen System lindern zu können.

Die Entwicklung dieser so genannten „GABA-Uptake-Hemmer“ ging dabei in den letzten Jahrzehnten sukzessive voran. Als Ausgangspunkt verwendete man rigidisierte Analoga von GABA, die eine Hemmung des Transportes von radioaktiv markierten GABA in Synaptosomen zeigten. Im **Abbildung 2** werden verschiedene dieser Leitverbindungen strukturell dargestellt. Diese GABA-Analoga wirken als kompetitive Inhibitoren an den GABA-Transportern.

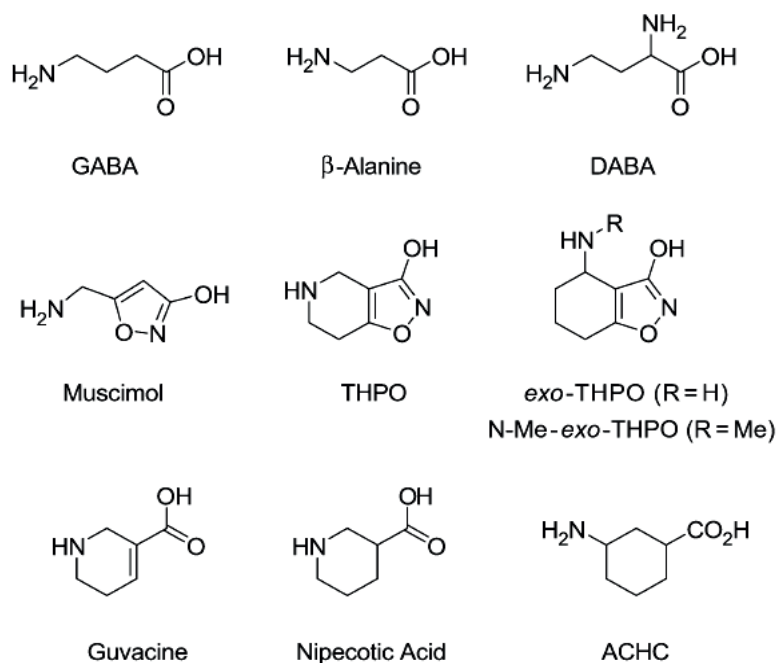


Abbildung 2: Leitstrukturen in der Entwicklung von GABA-Transporter-Hemmer [12]

Der erste große Erfolg in der Forschung nach GABA-Transporter-Hemmer war die Identifizierung von Verbindungen, welche an den GABA-Transportern wirken ohne eine Aktivität an den GABA-Rezeptoren zu zeigen. Während Muscimol eine Wirkung an den GABA-Transportern und GABA_A-Rezeptor entfaltetete, konnte mit (R)-Nipecotinsäure ein selektiver Transport-Hemmer identifiziert werden. Dabei ist zu sehen, dass Isomere unterschiedliche Affinität zu den Transportern beziehungsweise Rezeptoren aufweisen. Isoguvacin wirkt als GABA_A-Rezeptoragonist, während das isomere Guvacin spezifisch den

GABA-Transport inhibiert. Auch bei THIP, ein GABA_A-Rezeptoragonist, und THOP, ein GABA-Transport-Hemmer, verhält es sich in analoger Weise [12,14].

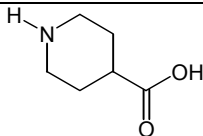
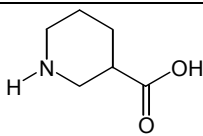
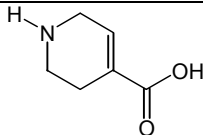
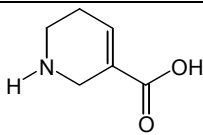
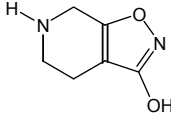
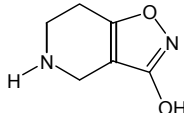
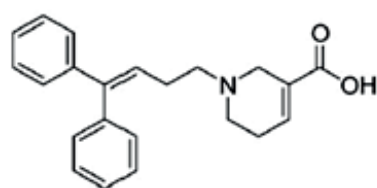
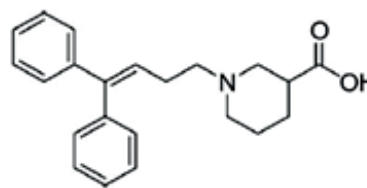
GABA _A -Rezeptor-Agonisten	GAT-Inhibitoren
 Isonipecotinsäure	 Nipecotinsäure
 Isoguvacin	 Guvacin
 THIP	 THPO

Abbildung 3: Isomere GABA_A-Agonisten und GABA-Transport-Inhibitoren

Als Leitstrukturen für die Entwicklung von oral wirksamen GABA-Transport-Inhibitoren wurden die in ihrer Konformation fixierten simplen GABA-Analoga wie Nipecotinsäure und Guvacin verwendet und durch Anhängen lipophiler Seitenketten modifiziert. Durch Anhängen von lipophilen Seitenketten am Stickstoff erhielt man die Verbindungen SKF89976-A und SKF100330-A, die fähig waren die Bluthirnschranke zu passieren. Oral verabreicht konnte eine antikonvulsive Wirkung festgestellt werden [Ali et al.,1985]. Im Gegensatz zu den einfachen GABA-Analoga stellten die lipophilen Derivate keine Substrate der GABA-Transporter dar [Larsen et al,1988].

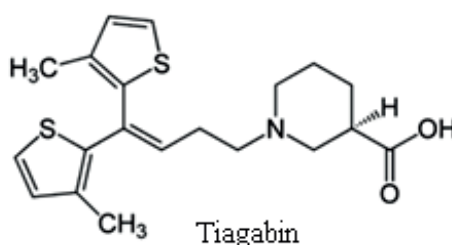


SKF100330A
N-4,4-diphenylbut-3-en-1-yl-Guvacin



SKF89976-A
N-4,4-diphenylbut-3-en-1-yl-Nipecotinsäure

Durch weitere Modifikation wurde Tiagabin entwickelt, ein oral wirksamer GABA-Transport-Hemmer, der in pharmakologischen Studien gute antikonvulsive Wirkungen zeigte [18]. Tiagabin wurde als Gabitril® zur Zusatzbehandlung bei Patienten mit partiellen Anfällen, die mit anderen Antiepileptika nicht ausreichend behandelbar sind, zugelassen.



3. GABA-Transporter-Subtypen [15,16,23-25]

Schousboe et al stellte bereits 1983 die These auf, dass eine Hemmung der glialen Wiederaufnahme im Vergleich zum neuronalen Uptake zu favorisieren sei, da in der Gliazelle eine Metabolisierung des Neurotransmitters stattfindet. Bestätigend wirkte die Demonstration der antikonvulsiven Wirkung von dem intracerebroventricular verabreichten glialen GABA-Uptake-Hemmer N-Methyl-exo-THPO. Dieser zeigte eine gleichstarke krampflösende Aktivität wie das Antiepileptikum Tiagabin, obwohl die GABA-Transporthemmung 100mal schwächer war.

Verschiedene Verbindungen wurden auf ihre Wirksamkeit, den neuronalen und glialen GABA-Transport zu hemmen, getestet. Dabei bestimmte man die Inhibition der Wiederaufnahme von radioaktiv markierten GABA in kultivierte Glia- und Nervenzellen. DABA (Diamino-buttersäure) und 3-Hydroxyvaleriansäure inhibierten hauptsächlich den neuronalen Transporter während β -Alanin und β -Prolin vor allem Antagonisten der glialen Wiederaufnahme waren.

Es zeigte sich jedoch, dass die Aufgabe, den glialen GABA-Transport selektiv zu blockieren, nicht so einfach zu bewerkstelligen ist. Anstatt einen neuronalen und einen glialen GABA-Transporter zu finden, kennt man heute vier verschiedene transmembranäre Subtypen und einen vesikulären GABA-Transporter. Radian et al konnten 1986 ein 80kDa schweres Glykoprotein in Synaptosomen der Ratte nachweisen, das abhängig von den Ionen Natrium und Chlorid den Neurotransmitter GABA transportieren konnte. Der anschließend von Guastella et al im Jahr 1990 geklonte und in *Xenopus* oocyten exprimierte Transporter bestand aus 599 Aminosäuren und war 67kDa schwer. Der als rGAT1 bezeichnete Transporter zeigte einen K_M -Wert für GABA von 7 μ M. Nelson et al (1990) gelang die Klonierung des menschlichen GAT1, der ebenfalls aus 599 Aminosäuren bestand. 1992 konnten aus dem Rattenhirn zwei weitere GABA-Transporter mit 602 beziehungsweise 627 Aminosäuren geklont werden (Borden et al). Verglichen mit dem rGAT1 wiesen sie eine 52% Homologie in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf, während sie eine 67% Übereinstimmung untereinander offenbarten. Diese Transporter der Ratte wurden, der Terminologie folgend, rGAT2 und rGAT3 genannt. Sie zeigten einen K_M -Wert für GABA von 8 μ M beziehungsweise 12 μ M. Der menschliche GAT3 wurde von Borden et al geklont (1994) und bestand aus 632 Aminosäuren. Ein weiterer Transporter für den Neurotransmitter GABA konnte aus der Spezies Ratte isoliert werden. Yamauchi et al gewannen 1992 aus der Niere einer Ratte ein aus 614 Aminosäuren bestehenden Transporter, der nicht nur GABA sondern auch Betain zu transportieren befähigt war. Dieser wurde als BGT-1 (=Betain-GABA-Transporter) bezeichnet [23].

Im selben Zeitraum wurden 4 GABA-Transporter aus der Spezies Maus geklont (Liu et al, 1992): mGAT1(598 Aminosäuren), mGAT2(614 Aminosäuren), mGAT3(602 Aminosäuren) und mGAT4(627 Aminosäuren). Dies schafft insofern eine gewisse Verwirrung in der

Nomenklatur, da offenbar der murine GAT2 der homologe Transporter zu BGT-1 ist und rGAT3 das entsprechende Homolog zu mGAT4. Die Nomenklatur der humanen GABA-Transporter entspricht jener der Spezies Maus. Die Tabelle 1 soll eine Verdeutlichung dieser Homologien darstellen.

Spezies Nomenklatur				
<i>Ratte</i>	GAT-1 ^a	BGT-1 ^b	GAT-2 ^c	GAT-3 ^c
<i>Mensch</i>	GAT-1 ^d	BGT-1 ^e	GAT-2 ^f	GAT-3 ^g
<i>Maus</i>	GAT ^h	GAT2 ^h	GAT-3 ^h	GAT4 ^h
<i>Homologie</i>	Mensch versus Ratte: 97%	Mensch versus Ratte: 86%	Mensch versus Ratte: 90%	Mensch versus Ratte: 95%
	Mensch versus Maus: 96%	Mensch versus Maus: 87%	Mensch versus Maus: 91%	Mensch versus Maus: 95%

^a Guastella et al. 1990

^b Yamauchi et al. 1992

^c Borden et al. 1992

^d Nelson et al. 1990

^e Borden et al. 1995

^f Christiansen et al. 2007

^g Borden et al. 1994

^h Liu et al. 1992, 1993

Tabelle 1: Gegenüberstellung von GABA-Transporter der einzelnen Spezies [15]

Allen Transportern gemeinsam ist die Tatsache, dass sie zu den Natrium- und Chloridionen abhängigen Transporter zählen. Sie bestehen nach heutigem Wissensstand alle aus zwölf Transmembranregionen (TM 1-12) und besitzen eine lange extrazelluläre Schleife zwischen TM3 und TM4 mit potentiellen Stellen für N-Glycosylierung. N- und C- terminales Ende sind intrazellulär lokalisiert und besitzen mögliche Phosphorylierungsstellen.

3.1. Lokalisierung der Subtypen [14,15,23,25]

Im Folgenden wird ausschließlich die GABA-Transporter-Nomenklatur der Spezies Maus verwendet!

Um die Funktion der einzelnen Subtypen der GABA- Transporter besser verstehen zu können, wurde deren mRNA-Verteilung sowohl subzellulär als auch im gesamten Organismus untersucht. Während GAT1 und GAT4 nur im Zentralnervensystem nachgewiesen werden konnte, wurde GAT2 und GAT3 auch in peripheren Geweben gefunden. Die Verteilung der mRNA wurde mittels reverser Polymerase-Kettenreaktion und Northern Blot Analyse untersucht. GAT-1 wurde in vielen Hirnregionen gefunden und war der Lokalisation von

GABA ähnlich, die durch Studien mit GABA-Antikörpern ermittelt wurde. Subzellulär wurde GAT1 im Bereich des synaptischen Spaltes gefunden und zwar vorwiegend an der neuronalen Membran. Dennoch ist die am Beginn der GABA-Transporter-Forschung aufgestellte Theorie, dass es sich bei GAT1 um den neuronalen GABA-Transporter handelt, nicht gänzlich korrekt, da auch auf Gliazellen GAT1 nachgewiesen werden konnte (Conti et al, 1998) [23]. Der Transporter GAT1 scheint offenbar für die Wiederaufnahme des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt zuständig zu sein. Auch GAT4 konnte in unterschiedlichen Hirnregionen im Bereich der GABAergen Synapse nachgewiesen werden, vorwiegend aber, im Gegensatz zu GAT-1, auf Gliazellen (Minelli et al, 1996). GAT3 wurde in Leptomeningen (= weiche Hirn- bzw. Rückenmarkshaut) gefunden und reguliert möglicherweise die GABA-Spiegeln in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit. Subzellulär wurde, rGAT3 auf Gliazellen und an Dendriten im extrasynaptischen Bereich detektiert. GAT2 wurde ebenfalls nicht im GABAergen synaptischen Bereich gefunden. Dieser Transporter wurde an Dendriten, die in Kontakt mit glutamatergen Neuronen standen, und am Zellkörper von Neuronen im Hippocampus gefunden (Zhu et Ong, 2004).

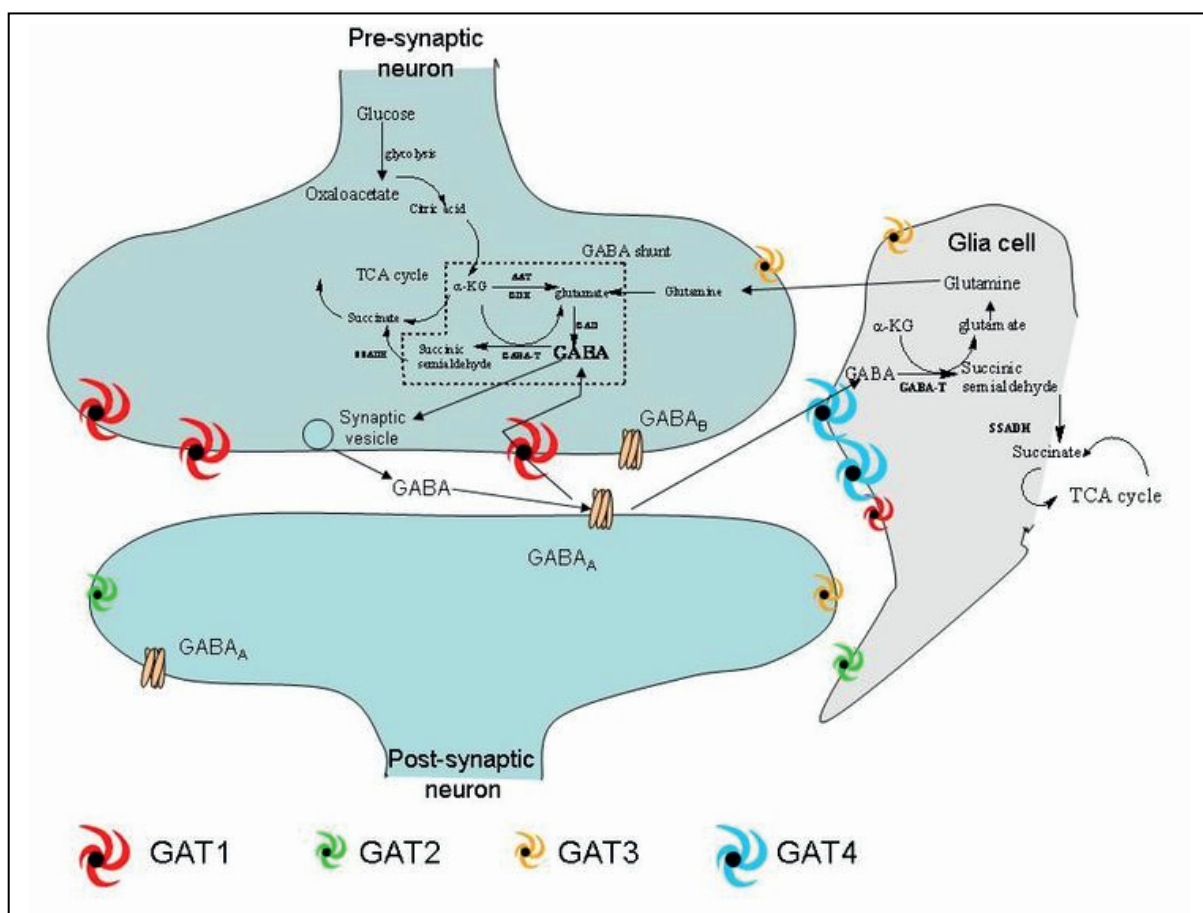


Abbildung 4 : vereinfachte Darstellung der subzellulären Lokalisation der GABA-Transporter-Subtypen [12]

Die großen Unterschiede der transmembranären GABA-Transporter-Subtypen in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation als auch ihrer Verteilung in den Hirnregionen führte zu der

Theorie, dass sie auch unterschiedliche Funktionen in der Feinabstimmung der inhibitorischen Neurotransmission wahrnehmen.

3.2. Pharmakologische Testung der GABA-Transporter-Subtypen

Um die Aufgaben der einzelnen Subtypen besser verstehen zu können, wurde die Stärke der [^3H]-GABA-Wiederaufnahmehemmung an den geklonten GABA-Transporter-Subtypen mit der antikonvulsiven Wirkung verglichen. Die bereits bekannten GABA-uptake-Inhibitoren zeigten eine starke Affinität zu GAT1 (siehe Tabelle 2). Auch der am Markt befindliche Arzneistoff Tiagabin stellt einen selektiv wirksamen GAT1-Inhibitor dar [17,23]. Für die anderen Subtypen wurde bis heute noch kein selektiver Inhibitor als Arzneistoff zugelassen. Dennoch beweisen verschiedene pharmakologische Studien, dass eine selektive Hemmung eines anderen Subtyps als GAT1 therapeutische Vorteile bringen könnte [12].

Compound	GABA uptake inhibition IC_{50} or $^aK_{m/i}$ (μM)				
	Neurons	Astrocytes	GAT1	GAT2	GAT3
GABA	8 ^a	32 ^a	17 ^a	51 ^a	15 ^a
Nipecotic acid	12	16	24	>1000	113
Guvacine	32	29	39	>1000	228
DABA	1000	>5000	128	528 ^c	300
ACHC	200	700	132	1070 ^c	>1000
β -Alanine	1666 ^b	843 ^b	2920	1100 ^c	66
THPO	501 ^b	262 ^b	1300	3000	800
Exo-THPO	780	250	1000	3000	>3000
N-Methyl-exo-THPO	405	48	450	>3000	>3000
N-Ethyl-exo-THPO	390	301	320	>1000	>1000
N-2-Hydroxyethyl-exo-THPO	300	200	>500	>500	>500
N-4-Phenylbutyl-exo-THPO	100	15	7	>500	>1000
N-Acetyloxyethyl-exo-THPO	200	18	550	>1000	>1000
(R/S)-EF1502	2	2	7	26	>300
(R)-EF1502	1.5	0.65	4	22	>150
(S)-EF1502	>100	>100	120	34	>150
N-DPB-THPO	38 ^b	26	30	200	>300
N-DPB-Nipecotic acid	1.3 ^b	2.0 ^b	0.64	7210 ^c	550
N-DPB-guvacine	4.9 ^b	4.2 ^b	–	–	–
N-DPB-exo-THPO	1.4	0.6	6	100	>100
N-DPB-N-Methyl-exo-THPO	5	2	2	200	>100
NNC 05-2090	–	–	19	1.4	41
SNAP-5114	–	–	>30	22	20
NNC-711	1.24	0.64	–	–	–
Tiagabine	0.45	0.18	0.11	>100	>100

*Data summarized from Bolvig et al. (1999), Borden (1996), Clausen et al. (2005), Falch et al. (1999), Larsson et al. (1981, 1983, 1986, 1988), Sarup et al. (2003a), Schousboe (1979), Suzdak et al. (1992), Thomsen et al. (1997), White et al. (2002)

^a K_m

^b K_i

^cHuman BGT-1

Tabelle 2 [12]

K_m = Michaelis-Menten-Konstante; K_i = Cheng-Prusoff Gleichung

Zur Bestimmung des antikonvulsiven Effekts von GAT-Inhibitoren, wurden an den Versuchstieren durch Lärm, mit Elektroschock oder chemisch, zum Beispiel mit Pentylentetrazol, epileptische Anfälle provoziert.

Die GABA-Wiederaufnahme-Hemmung wird als IC_{50} -Wert (= Konzentration, die eine 50%-ige Inhibition der Aufnahme bewirkt) angegeben.

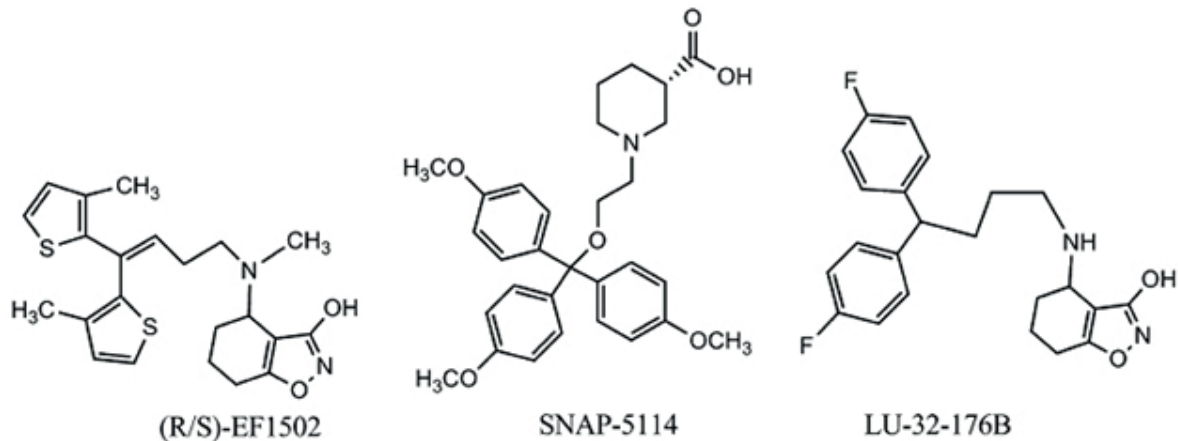


Abbildung 5: Struktur von EF1502(mGAT1 und mGAT2-Inhibitor), Lu-32-176B(mGAT1 -Inhibitor) und SNAP-5114 (mGAT3 und mGAT4-Inhibitor) [13]

Eine von White et al[1995] durchgeführte Studie zeigte, dass eine Hemmung des GAT2 therapeutisch von Nutzen sein könnte. EF1502, der an GAT1 und GAT2 als Inhibitor fungiert, zeigte eine breite antikonvulsive Wirkung. Um den Anteil der GAT2-Hemmung an der krampflösenden Wirkung zu bestimmen, wurde EF1502 gleichzeitig mit den GAT1-Inhibitor Tiagabin beziehungsweise Lu-32-176B verabreicht. EF1502 zeigte mit einem GAT1- Inhibitor eine synergistische antikonvulsive Wirkung, während die Nebenwirkungen nicht vergrößert wurden. Als die beiden GAT1-Inhibitoren Tiagabin und Lu-32-176B gemeinsam getestet wurden, war nur ein additiver antikonvulsiver Effekt zu beobachten. Diese Resultate sprachen dafür, dass eine GAT2-Hemmung einen wichtigen therapeutischen Ansatz darstellen könnte. Um weiter das therapeutische Potential der einzelnen Subtypen zu definieren, testeten Karsten Madsen und Rasmus Clausen den GAT3/4-Inhibitor SNAP-5114, den GAT1/2 Inhibitor EF1502 und den GAT1-Inhibitor Tiagabin alleine und in verschiedenen Kombinationen auf ihre antikonvulsive Wirkung in Mäusen [13]. Alle drei GABA-uptake-Inhibitoren zeigten eine krampflösende Wirkung. Tiagabin präsentierte den stärksten, SNAP-5114 den schwächsten antikonvulsiven Effekt. SNAP-5114 wirkte mit EF1502 synergistisch, mit Tiagabin jedoch nur additiv. Diese Resultate bestärken die Annahme, dass sich GAT3 und GAT4 in der Nähe des synaptischen Spaltes und somit in Nachbarschaft zu GAT1 befinden, während GAT2 weiter entfernt sei. Die Hemmung sich entfernt gelegener GABA-Transporter

könnte somit Bereicherungen bringen, da synaptisch und extrasynaptische GABA-Rezeptor aktiviert werden.

Eine Studie [24], durchgeführt von Xiao-Tao Jin und Jean-Francois Pare, untersuchte die Bedeutung von rGAT1 und rGAT3 im Globus Pallidus der Ratte. Dabei zeigte sich, dass SKF 89976A, ein rGAT1-Hemmer, die Abfallzeit von eIPSCs (= Evoked inhibitory post-synaptic current; hervorgerufene inhibitorische postsynaptische Strom) nach Stimulation vom Striatum verlängerte. Die Amplitude des eIPSC wurde nicht beeinflusst. SNAP 5114, ein semi-selektiver rGAT3-Hemmer, beeinflusste hingegen sowohl Abfallzeit als auch die Amplitude des eIPSC. Eine gemeinsame Verabreichung von SKF 89976A und SNAP 5114 steigerte die Abfallzeit und Amplitude des eIPSC nochmals. GABA_A-Rezeptor vermittelte Ströme konnten bei hohen Konzentrationen von SKF 89976A und von SNAP 5114 gemessen werden.

Zusammenfassend, konnte diese Studie die Annahme unterstützen, dass rGAT1 und rGAT3 verschiedene, sich gegenseitig unterstützende, feinabgestimmte Rollen im inhibitorischen GABA-System im Globus Pallidus wahrnehmen.

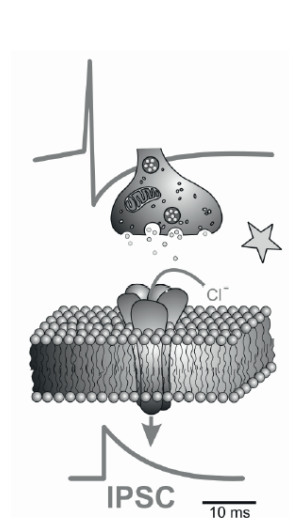


Abbildung 6: Entstehung eines Inhibitorischen Postsynaptischen Stromes (IPSC)

Auch Keros & Hablitz (2005); Kirmse et al. (2009) zeigten dass rGAT1 und rGAT3-Hemmer die phasische und tonische GABA_A-Aktivität synergistisch beeinflussen.

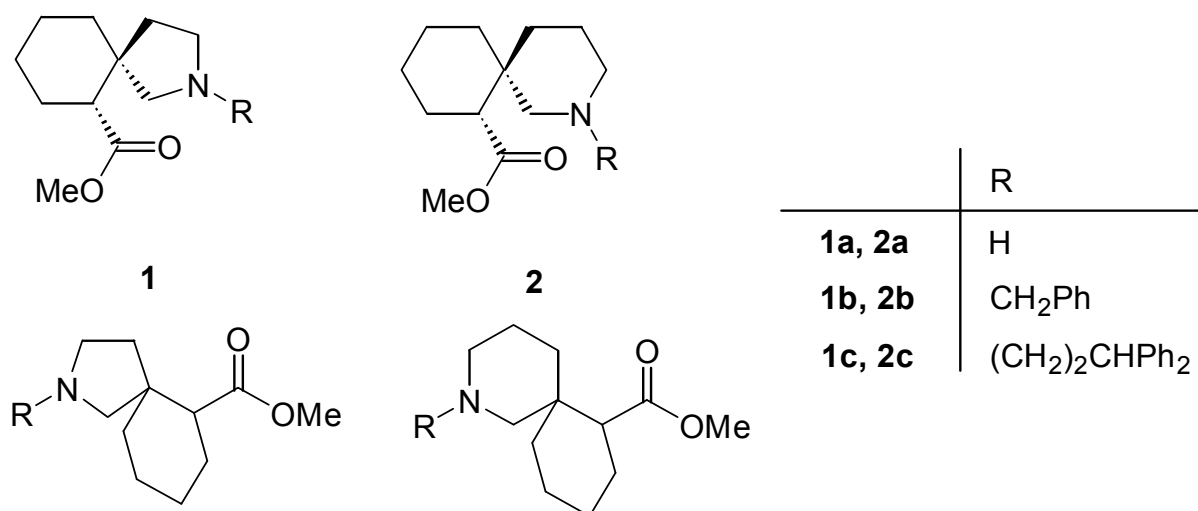
Dennoch sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um das therapeutische Potenzial der einzelnen GAT-Subtypen nutzen zu können. Dafür ist die Grundlagenforschung hinsichtlich der verschiedenen Subtypen der GABA-Transporter weiterhin von bedeutender Rolle.

4. Spirocyclische GABA-Analoga als GABA-uptake-Hemmer

Am Institut für Pharmazeutische Chemie Wien, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Urban, wird schon seit mehr als einem Jahrzehnt an der Synthese von spirocyclischen Aminosäureestern mit GABA-analoger Struktur gearbeitet [1-10]. **Schema 2** zeigt die bisherigen Zielmoleküle **1a-g** bis **6a-g** des Projektes meines Diplomarbeitbetreuers. Dabei unterscheiden sich die Spirocyclen sowohl in der Atomanzahl des isocyclischen Ringes (Cyclopentan- oder Cyclohexanring), als auch in der Größe des Heterocyclus (Pyrrolidin- oder Piperidinring).

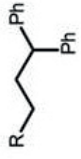




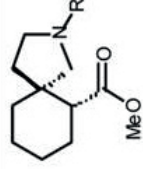
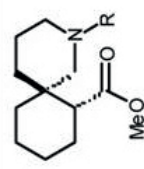
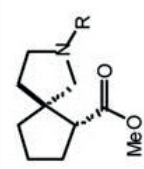
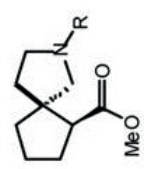
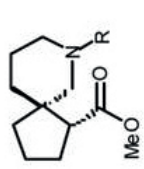
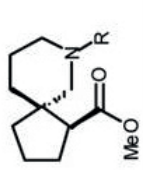
Mit den spirocyclischen Aminosäureester **1b**, **1c**, **2b** und **2c** wurden die ersten biologischen Testungen durchgeführt und ihre Wirkung als selektive GABA uptake Inhibitoren konnte nachgewiesen werden. Deren Spezifität ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die konformationelle Beweglichkeit der Moleküle stark eingeschränkt ist [1-10].

Durch die Einführung einer Arylalkylseitenkette am basischen Stickstoff gelang es schließlich lipophile GABA-Analoga herzustellen, die fähig sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.



Schema 1: Struktur der spirocyclischen Aminosäureester **1a-c** und **2a-c**: die untere Formelschreibweise zeigt die strukturelle Verwandtschaft zu GABA; die obere Schreibweise verdeutlicht die spirocyclische Grundstruktur und die Konfiguration an den beiden Chiralitätszentren[1,2,22]

Eine pharmakologische Untersuchung der spirocyclischen GABA-Analoga hat gezeigt, dass die GABA-uptake-inhibierende Wirkung durch die Verlängerung der Arylalkylseitenkette steigt und dass jene GABA-Analoga mit 5-gliedrigem heterocyclischen Ring besser wirksam sind als die Spirocyclen mit 6-gliedrigem heterocyclischen Ring. Die mittlere inhibierende Konzentration des aktivsten Derivats **1c** beträgt 7.6 μ M. Verglichen mit den wirksamsten GABA-uptake-Inhibitoren SKF89976A (IC_{50} = 0.33 μ M) oder Tiagabin (IC_{50} = 0,065 μ M) handelt es sich bei dem spirocyclischen Aminosäureester **1c** um einen GABA-Wiederaufnahmehemmer mittelstarker Wirksamkeit [1-10].

	R-H	R-CH ₂ Ph					
	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g
	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g
	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g
	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g

Schema 2: Spirocyclische Aminosäureester als GABA uptake Inhibitoren (Zielmoleküle)

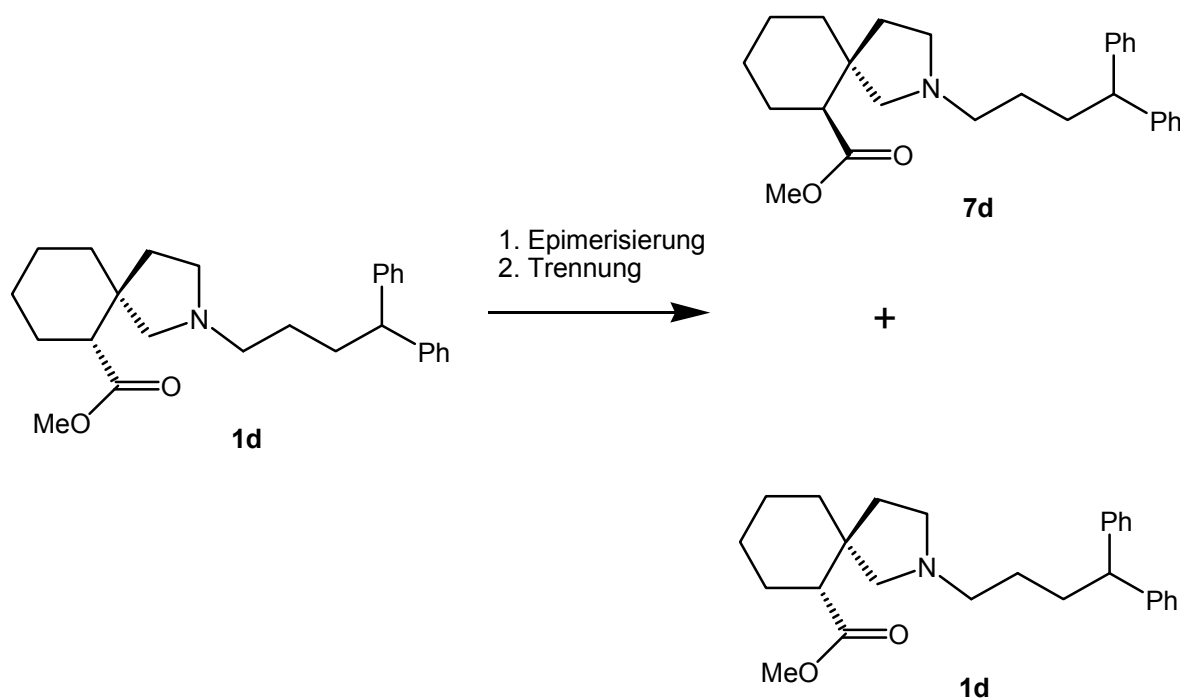
Die Aktivität ist dennoch bemerkenswert im Angesicht dessen, dass die Verbindung nicht als freie Carbonsäure, sondern als Ester vorliegt [1-10,22], zumal nach der bisher allgemein akzeptierten Theorie eine freie Carboxylgruppe für GABA-Analoga als pharmakophores Strukturelement gilt.

Die Tatsache, dass nicht nur die Konstitution sondern besonders auch die Konformation der Moleküle bei der Bindung an spezielle GABA-Transporter-Subtypen [GAT1-4] eine große Rolle spielen dürfte, veranlasste uns, auf dem Gebiet der spirocyclischen Aminosäureester weiter zu forschen und diastereomerenreine spirocyclische GABA-Analoga herstellen zu wollen.

Themenstellung:

Aufgabe dieser vorliegenden Diplomarbeit war die Synthese von (5*RS*,6*SR*)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl-2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat und die Bildung des Oxalatsalzes dieser Verbindung. Als Ausgangsmaterial verwendete ich das entsprechende (5*RS*,6*RS*)-Diastereomer, das bereits synthetisiert wurde und nun für die Epimerisierung Verwendung finden konnte. Augenmerk dieser Diplomarbeit war nun, die geeignete Base für die Epimerisierung zu finden und dann das gewünschte Diastereomer zu isolieren und spektroskopisch zu charakterisieren. Desweiteren wurden auch Versuche gemacht die Verbindung (6*RS*,7*SR*)- Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[5.5]undecan-7-carboxylat aus dem entsprechenden (6*RS*, 7*RS*)- konfigurierten Diastereomer zu synthetisieren.

Weitere Aufgabe bestand darin, die bereits mehr als 10 Jahre alten Salze **1cOX**, **1dFU**, **1dOX**, **1eFU**, **1fOX** und **1gFU**, auf ihre Identität und Stabilität zu überprüfen.



Schema 3: Zielmoleküle und Ausgangsmaterialien der vorliegenden Diplomarbeit.

Dabei muss man sich bewusst sein, dass es sich bei den Formeln **1d** und **7d** um Razemate handelt. Das bedeutet, dass **1d** und **7d** nicht zwei einzelne Enantiomere sind, sondern zwei Enantiomerenpaare, die sich zueinander diastereomer verhalten.

Hauptteil

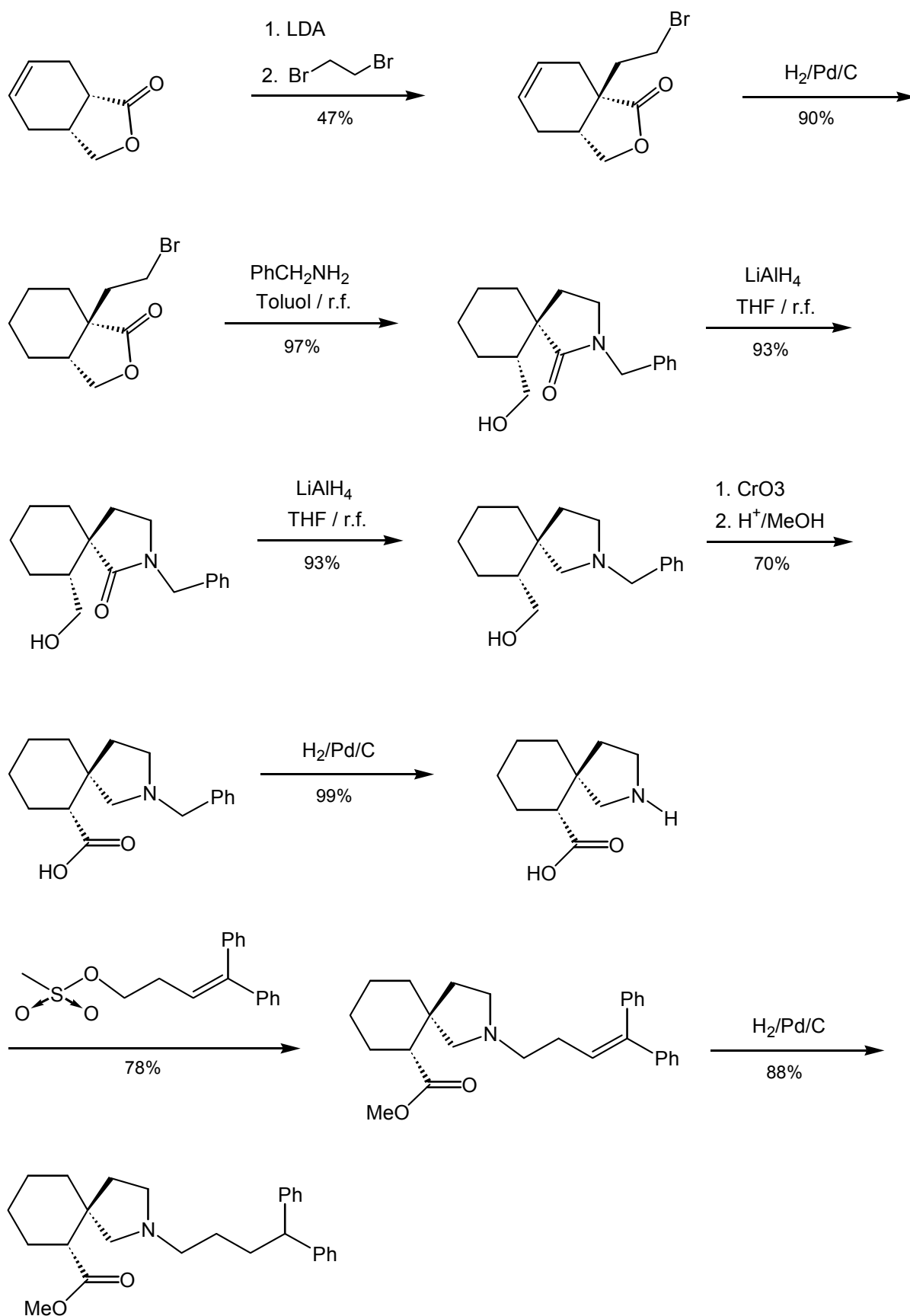
1. Synthese von (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat

Die Herstellung von (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat und die Optimierung von diesem Verfahren wurde bereits in etlichen Diplomarbeiten behandelt. **Schema 4** gibt eine grobe Zusammenfassung dieser Synthese wieder [2,4].

Durch Metallierung mit Lithiumdiisopropylamid (= LDA) wird die α -Position der Lacton-carbonylgruppe im bicyclischen Lacton (3aRS, 7aRS)-3a,4,7,7a-tetrahydroisobenzofuranon aktiviert und anschließend mit 1,2-Dibrom-ethan alkyliert. Durch Vacuumdestillation gelingt die Isolierung von (3aRS,7aRS)-7a-(2-Bromethyl)-tetrahydroisobenzofuranon. Die Hydrierung der Doppelbindung im bicyclischen Lacton gelingt in Gegenwart des Katalysators Palladium auf Aktivkohle bei Normaldruck und man erhält das gesättigte Lacton in nahezu quantitativer Ausbeute. Setzt man nun das Bromalkyl-lacton mit Benzylamin um, so erfolgt zuerst eine Substitution des Bromatoms durch den Stickstoff des Benzylamins zu einem instabilen Zwischenprodukt und dann eine Umlagerung zum Hydroxyalkyllactam. Die Reduktion des Pyrrolidonderivats zum Pyrrolidinderivat gelingt mit Lithiumaluminiumhydrid. Man erhält das spirocyclische Amin (5RS,6RS)-N-Benzyl-6-hydroxymethyl-2-azaspiro[4.5]decan.

Als nächster Schritt erfolgt die Oxidation der Hydroxymethylgruppe mit Hilfe von Jones Reagens, einer Lösung von Chromtrioxid in wässriger Schwefelsäure. Das überschüssige Oxidationsmittel kann nach der Beendigung der Reaktion durch Zusatz von Isopropanol vollständig reduziert werden. Die nachfolgende Veresterung gelingt, indem die Aminosäure in der Teflonhülse eines Autoklaven in Methanol gelöst wird, mit H_2SO_4 versetzt und 16 h auf 110 °C erhitzt wird.

Bevor die Arylalkylreste am Stickstoff des spirocyclischen Amins eingeführt werden können, ist es notwendig den Benzylrest zu entfernen. Die Debenzylierung von spirocyclischen Aminen bewerkstelligt man durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle in siedendem Methanol. Es wird 24 Stunden im Autoklaven bei 4bar hydriert. Die Einführung des Arylalkylrestes am sekundären Stickstoff vollführt man durch Alkylierung mit dem entsprechenden Methansulfonsäureester.



Schema 4: Diastereoselektive Synthese von (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat [2,4]

Den Baustein Diphenylbut-3-enylmethansulfonat erhält man, indem man 4,4-Diphenylbutan-1,4-diol mit 4-Dimethylaminopyridin (= DMAP), Triethylamin sowie Methansulfonsäurechlorid reagieren lässt.

Der letzte Schritt ist die Hydrierung von (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbut-3-en-yl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat. Dies gelingt leicht mit Hilfe von Palladium auf Aktivkohle. Man erhält schließlich die gewünschte Verbindung (5RS,6RS)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (**1d**). Der Strukturbeweis für **1d** lässt sich durch die Aufnahme eines Protonenresonanzspektrums erbringen. Charakteristisch sind das Triplett ($J = 7.8 \text{ Hz}$) bei 3.88 ppm, das vom Proton am C-4' stammt, und das Singulett der Methylgruppe bei 3.58 ppm [2;4].

2. Bisherige Versuche zur Trennung von diastereomeren spirocyclischen GABA-Analoga

Bereits aus vorangegangenen Diplomarbeiten sind experimentelle Daten zur Trennung von spirocyclischen GABA Analoga auf der Stufe der spirocyclischen Carbonitrile vorhanden. So konnten zum Beispiel die diastereomeren 2-Aza-spiro[4.4]nonan-6-carbonitrile durch Flash-Chromatographie getrennt werden.

Die Trennung der Nitrile für die weitere Synthese diastereomerenreiner spirocyclischer Aminosäureester erübrigt sich jedoch, da die anschließend notwendige Verseifung der Nitrilgruppe zum spirocyclischen Methylester mit einer teilweisen Epimerisierung am α -Kohlenstoff des Carbaminsäureesters einhergeht [3].

Deshalb wurde in dieser vorliegenden Diplomarbeit versucht, direkt auf der Stufe der spirocyclischen Aminosäureester eine Trennung der Diastereomeren zu erreichen um somit das gewünschte Diastereomer rein erhalten zu können.

3. Stabilitätsprüfung von den Salzen der spirocyclischen Aminosäureester

Da ich im Rahmen meiner Diplomarbeit verschiedene Salze spirocyclischer Aminosäureester verwendete, die von früheren Diplomanden vor mehr als zehn Jahren synthetisiert wurden, musste natürlich anfangs geprüft werden, ob sich die Verbindungen zersetzt haben oder stabil geblieben sind.

Nicht nur als Eingangskontrolle für meine Untersuchungen ist die Stabilität dieser Verbindungen wesentlich, sondern auch für eine zukünftige Verwendung dieser Substanzen als Arzneistoffe ist Stabilität eine grundlegende Voraussetzung. Deshalb wurden die Identität und Stabilität der Azaspiro[4.5]decane **1cOX**, **1dFU**, **1dOX**, **1eFU**, **1fOX** und **1gFU** überprüft.

Der Strukturbeweis ließ sich durch die Aufnahme von Protonen und Kohlenstoffresonanzspektren erbringen.

Sehr aussagekräftig ist ein Vergleich der Signalintensitäten der aromatischen Protonen mit den Wasserstoffen der Methoxygruppe. Da ein Intensitätsverhältnis von 10:3 vorlag, konnte davon ausgegangen werden, dass die Carboxylgruppe vollständig verestert war und somit keine Hydrolyse im Zuge der Lagerung stattgefunden hat.

4. Strukturaufklärung der spirocyclischen Aminosäureester durch Kernresonanzspektroskopie

Die Protonenspektren der Azaspiro[4.5]decane und Azaspiro[5.5]undecane zeigen charakteristische Signale im Aromatenbereich, die von den Phenylresten der Seitenkette stammen. Weitere Schlüsselsignale sind die als Singulett detektierbaren Methoxygruppen der spirocyclischen Ester. Die dem Stickstoff benachbarten Methylengruppen können aufgrund der tieffeldigen Lage von den aliphatischen Protonen der Spirocyclen unterschieden werden. Erschwerend für die Zuordnung ist allerdings die „glockige“ Form der Signale, welche auf eine konformativ eingeschränkte Beweglichkeit der Ringe am Spirozentrum hindeutet. Durch die große Signalbreite resultiert vielfach eine Überlagerung der Resonanzlinien, sodass für die Interpretation wichtige Kopplungskonstanten nicht bestimmbar sind.

Die Kohlenstoffresonanzspektren der Azaspiro[4.5]decane und Azaspiro[5.5]undecane zeigen typische Signale im Aromatenbereich, die von den Kohlenstoffen der Seitenkette stammen. Eindeutig zuordenbar sind auch die Resonanzen der Methoxygruppen und der zu den Carboxylgruppen α -ständigen Methinkohlenstoffen. Verschiebungsmäßig abgesetzt kommen die dem Stickstoff benachbarten Methylengruppen zur Resonanz und lassen sich somit von den übrigen Methylengruppen zweifelsfrei unterscheiden. Allerdings resultieren aus der konformativ eingeschränkten Beweglichkeit der Ringe am Spirozentrum auch in den Kohlenstoffresonanzspektren „glockige“ Signale, sodass die Ortung gelegentlich nur unter Einbeziehung der 2D-Spektren möglich ist.

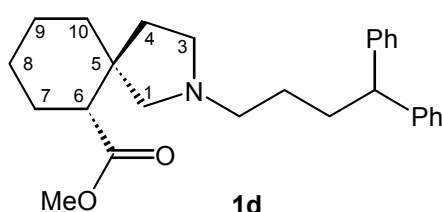
Einen wesentliche Beitrag zur Lösung dieser Problematik liefert somit die Interpretation der HSQC-Spektren. Durch diese zweidimensionale Aufnahmetechnik gelingt eine Korrelation zwischen Kohlenstoffen und Wasserstoffen, die direkt aneinander gebunden sind. Bereiche, die in den eindimensionalen Protonenresonanzspektren hoffnungslos überlagerte Resonanzen zeigen, ergeben in den HSQC-Spektren eindeutig getrennte Signale und erlauben die Korrelation mit dem über eine Bindung verknüpften Kohlenstoff. „Glockige“ Signale werden in diesen Spektren praktisch nicht beobachtet. Die mittlere Resonanzfrequenz der Protonen und Kohlenstoffe, die anhand der 1D-Spektren nicht zuordenbar ist, kann dadurch eindeutig geklärt werden (siehe Tabellen).

Informationen über die Konstitution des Kohlenstoffgerüsts kann aus den HMBC-Spektren entnommen werden. Diese zweidimensionale Aufnahmetechnik ermöglicht eine Korrelation zwischen Kohlenstoffen und Wasserstoffen, die über 2-3 Bindungen aneinander gebunden sind. Hierdurch können auch die quartären Kohlenstoffe in die Betrachtungen zur Strukturaufklärung eingebunden werden.

Als dritte 2D-Methode kam Protonenkorrelations-Spektroskopie (^1H - ^1H -COSY) zum Einsatz, durch welche die Nahbeziehungen zwischen geminal und vicinal benachbarten Protonen detektiert werden können.

Somit ergeben sich aus den gesammelten Spektraldaten zweifelsfrei die in den Formelbildern wiedergegebenen Konstitutionen der analysierten spirocyclischen Fumarate und Oxalate.

Erhärtet werden die Zuordnungen durch einen Vergleich mit den Daten der freien Basen (siehe Tabellen), wobei die größten Verschiebungsunterschiede an den, dem Stickstoff benachbarten, Methylengruppen zu beobachten sind.



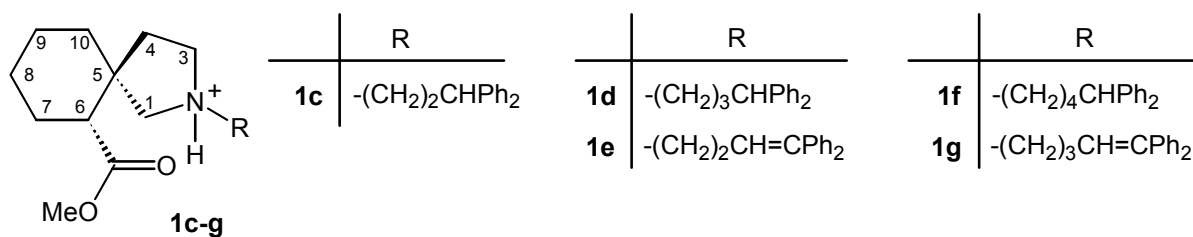
1d		1dFU	1dOX
	freie Base	Fumarat	Oxalat
C-1	61,61	?	57,44
C-3	53,33	52,13	53,03
C-4	38,18	36,57	37,05
C-5	43,62	43,64	43,77
C-6	50,74	50,55	50,93
C-7*	26,68	27,14	27,50
C-8*	23,70	23,91	24,16
C-9	23,03	22,89	23,06
C-10	37,45	36,57	37,69
COO	175,00	175,18	175,40
OCH ₃	51,20	52,13	51,90

Schema 5: Exemplarischer Vergleich der freien spirocyclischen Basen mit den entsprechenden Oxalaten und Fumaraten (* Zuordnung nicht gesichert)

HSQC: (= Heteronuclear Single Quantum Coherence)

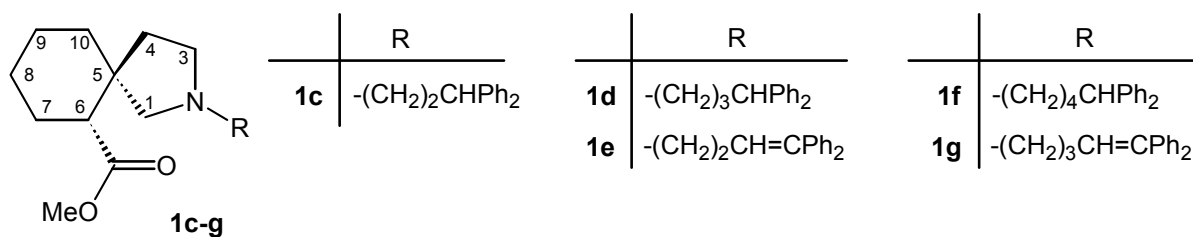
HMBC: (= Hetero Multiple Bond Correlation)

COSY = Correlation Spectroscopy



1c	1d		1e	1f	1g
Salz	OX	FU	OX	FU	FU
C-1	57,72	?	57,44	?	57,45
C-3	53,19	52,13	53,03	52,14	53,09
C-4	36,90	36,57	37,05	36,60	37,01
C-5	43,74	43,64	43,77	43,68	43,73
C-6	50,82	50,55	50,93	50,60	50,88
C-7	27,41	27,14	27,50	27,14	27,49
C-8	24,07	23,91	24,16	23,77	24,13
C-9	22,95	22,89	23,06	22,91	23,04
C-10	37,47	36,57	37,69	36,60	37,59
Ester COO	175,17	175,18	175,40	175,13	175,35
OCH ₃	51,83	52,13	51,90	51,74	51,88
COO	162,90	170,28	162,65	170,28	162,88
Fumarat CH	--	135,13	--	135,14	-
C-1'	54,56	54,99	55,43	54,68	55,55
C-2'	30,99	23,91	24,07	26,14	25,49
C-3'	48,85	32,46	32,43	122,73	25,26
C-4'	--	50,55	50,55	145,07	34,88
C-5'	--	--	--	--	51,05
Ar C-1	142,66	144,09	143,84	141,64	144,44
				139,11	
Ar C-2, C-6	127,45	127,68	127,64	129,47	127,69
			127,62	127,19	
Ar C-3, C-5	128,82	128,52	128,62	128,48	128,46
				128,11	
Ar C-4	126,83	126,29	126,48	127,43	126,21
				127,32	

Tabelle 3: ^{13}C -Verschiebungen der arylalkylsubstituierten 2-Azaspiro[4.5]decane



1c		1d	1e	1f	1g
C-1	61,57	61,61	61,74	61,61	61,74
C-3	53,27	53,33	53,38	53,34	53,38
C-4	38,05	38,18	38,05	38,04	38,05
C-5	43,67	43,62	43,62	43,61	43,62
C-6	50,69	50,74	50,84	50,79	50,84
C-7	23,66	23,70	23,69	23,68	23,69
C-8	26,72	26,68	26,73	26,71	26,73
C-9	23,01	23,03	23,09	23,06	23,09
C-10	37,38	37,45	37,49	37,45	37,49
COO	175,04	175,00	175,11	175,05	175,11
OCH ₃	51,18	51,20	51,19	51,21	51,19
C-1'	54,51	56,14	56,11	56,22	55,96
C-2'	34,20	27,04	29,17	28,49	28,92
C-3'	48,87	33,48	127,71	25,92	27,82
C-4'	--	51,08	140,05	35,52	129,69
C-5'	--	--	--	51,15	140,14
Ar C-1	144,88	145,06	142,60 142,10	145,10	142,72 141,59
Ar C-2, C-6	128,28	128,24	129,76	128,27	129,85
Ar C-3, C-5	127,79	127,74	128,05 127,92	127,75	128,06 127,98
Ar C-4	125,96	125,88	126,79 126,69	125,90	126,76 126,70

Tabelle 4: ^{13}C -Verschiebungen der arylalkylsubstituierten 2-Azaspiro[4.5]decane

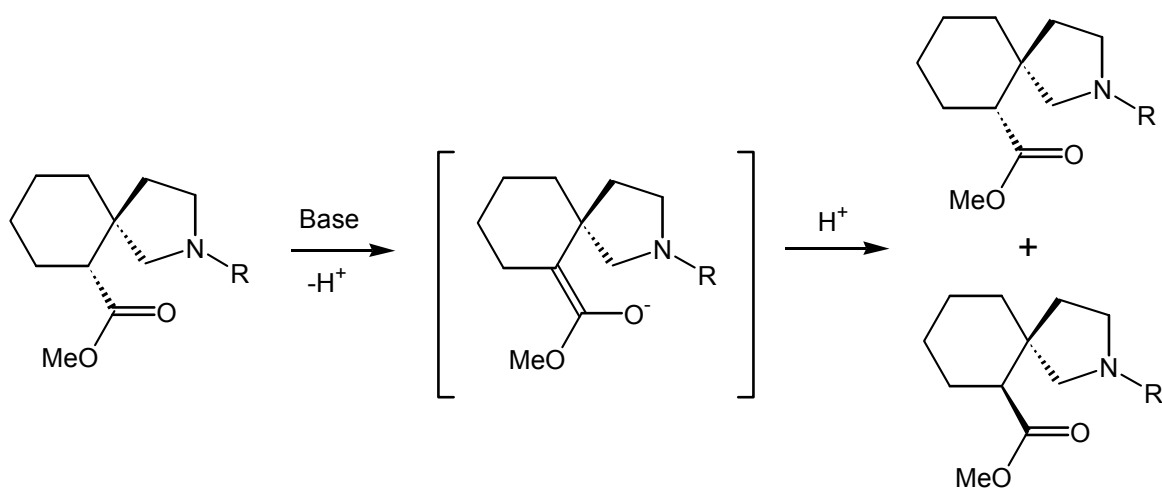
Die in Tabelle 3 und Tabelle 4 gezeigten Signallagen der Kohlenstoffe entsprachen jenen, die vor mehr als 10 Jahren nach der Synthese der jeweiligen Verbindung detektiert wurden. Somit konnte bewiesen werden, dass die Salze der spirocyclischen Aminosäureester stabil geblieben sind und sich durchaus für die Verwendung als Testsubstanzen eignen könnten.

5. Überführung der Salze der spirocyclischen Aminosäureester in die freie Base

Bevor man sich der Epimerisierung der spirocyclischen Aminosäureester widmen konnte, überführte man die Salze **1dOX** bzw. **1dFU** und **2dOX**, die von früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Urban hergestellt wurden, in die freie Base und ermittelte durch DC die R_f-Werte. Dafür wurde das jeweilige Salz in Dichlormethan gelöst und mit 2 N Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Nach Abtrennen der wässrigen Phase wurde das Lösungsmittel Dichlormethan bei verminderten Druck abgedampft. Die erhaltenen beigen Öle stellten die freien Basen **1d** bzw. **2d** der spirocyclischen Aminosäureester dar, welche für die nachfolgenden Epimerisierungen Verwendung finden konnten. Als Strukturbeweis wurde ein Protonenresonanzspektrum aufgenommen. Ein Vergleich der Signalintensitäten der aromatischen Protonen mit den Wasserstoffen der Methoxygruppe (10:3) belegte, dass die Carboxylgruppe immer noch vollständig verestert war und somit keine Hydrolyse im Zuge der Basenfreisetzung erfolgt ist.

Versuche die Salze **1dOX** bzw. **1dFU** und **2dOX** direkt für die Epimerisierung zu verwenden ergaben eindeutig Nachteile, da ein größerer Überschuss der eingesetzten basischen Epimerisierungsreagentien nötig war und somit mehr Artefakte gebildet wurden.

6. Epimerisierung durch Enolisierung und anschließende Reprotonierung des Enolates



Generell weisen die in dieser Diplomarbeit bearbeiteten spirocyclischen Aminosäureester zwei Chiralitätszentren auf. Während der quartäre spirocyclische Kohlenstoff als konfigurationsstabil anzusehen ist, sollte der zur Carboxylgruppe α -ständige Kohlenstoff durch Enolisierung und anschließende Reprotonierung des Enolates epimerisierbar sein. In weiterer Folge wurden starke Basen für diese Umsetzung auf ihre Brauchbarkeit getestet.

6.1. Epimerisierungsversuche mit Triphenylmethyl-Lithium

Zu Beginn der Versuche wurde die Base Triphenylmethyl-Lithium, welche man durch die Umsetzung von Triphenylmethan mit n-Butyllithium gewinnen konnte, verwendet. Dabei erwartete man sich von Triphenylmethyl-Lithium zwei entsprechende Vorteile:

1. Triphenylmethyl-Lithium hat einen sperrigen Rest, wodurch man sich eine gewisse Selektivität bei der Epimerisierung erhoffte.
2. Triphenylmethyl-Lithium wirkt durch das konjugierte System gleichzeitig als Indikator für die Vollständigkeit der Enolisierung, wobei der Überschuss der Base anhand der Rotfärbung der Reaktionsmischung nachweisbar war.

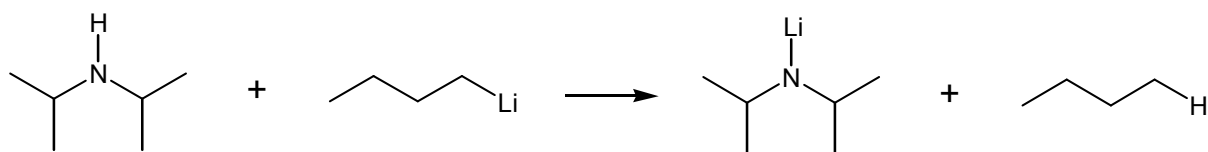
Triphenylmethan wurde unter Argonatmosphäre in getrocknetem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0°C gekühlt und mit n-Butyllithium versetzt. Das daraus entstandene Triphenylmethyl-Lithium tropfte man zu der auch in getrocknetem Tetrahydrofuran gelösten und auf -78°C gekühlten Lösung des spirocyclischen Aminosäureesters **2d**. Als die entsprechende Rotfärbung auftrat, beendete man die Reaktion, indem man 2N Salzsäure zu der Reaktionsmischung im Überschuss zugab, wodurch das überschüssige Triphenylmethyl-Lithium wieder hydrolysiert wurde.

Probleme bereite aber leider die Aufarbeitung dieses Ansatzes. Es wurde erwartet, dass Triphenylmethan durch Ausschütteln mit Toluol abtrennbar sein sollte und das Hydrochlorid des spirocyclischen Aminosäureester aus der wässrigen Phase nach Alkalisieren isolierbar wäre. Da der spirocyclische Aminosäureester aber, besonders wegen der lipophilen Seitenkette am Stickstoff einen sehr apolaren Charakter besitzt, blieb der Aminosäureester als Hydrochlorid gemeinsam mit Triphenylmethan in der Toluolphase. Deshalb haben wir beschlossen weitere Epimerisierungsversuche mit leichter abtrennbaren Basen zu untersuchen.

6.2. Epimerisierungsversuche mit LDA

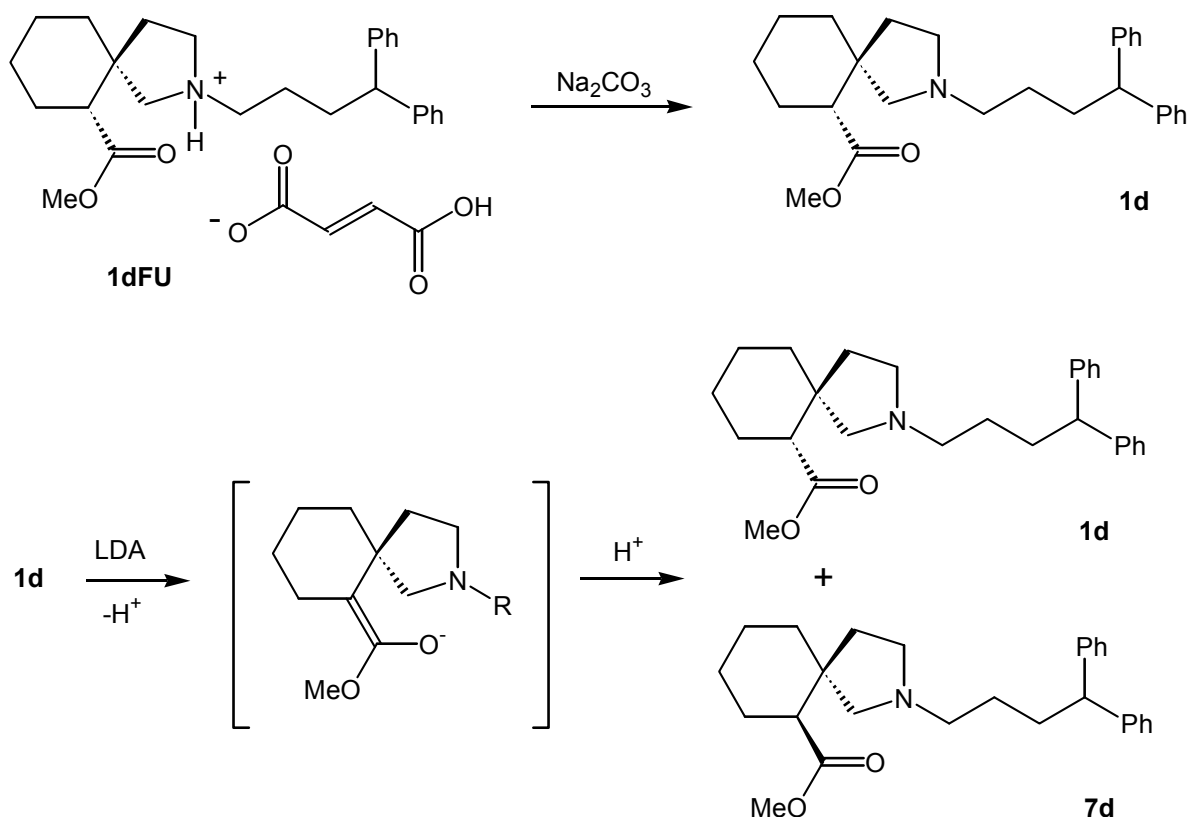
In den weitem Epimerisierungsversuchen wurde die starke Base Lithiumdiisopropylamid (= LDA) verwendet, die sich zur Deprotonierung der zur Carboxylgruppe α -ständigen CH-aciden Position bestens eignen sollte.

Die LDA-Herstellung erfolgte, indem man in einem Metallierkolben unter Argonatmosphäre eine Lösung von Diisopropylamin in Tetrahydrofuran bereitete und anschließend diese bei einer Temperatur von 0°C mit n-Butyllithium in Hexan versetzte.



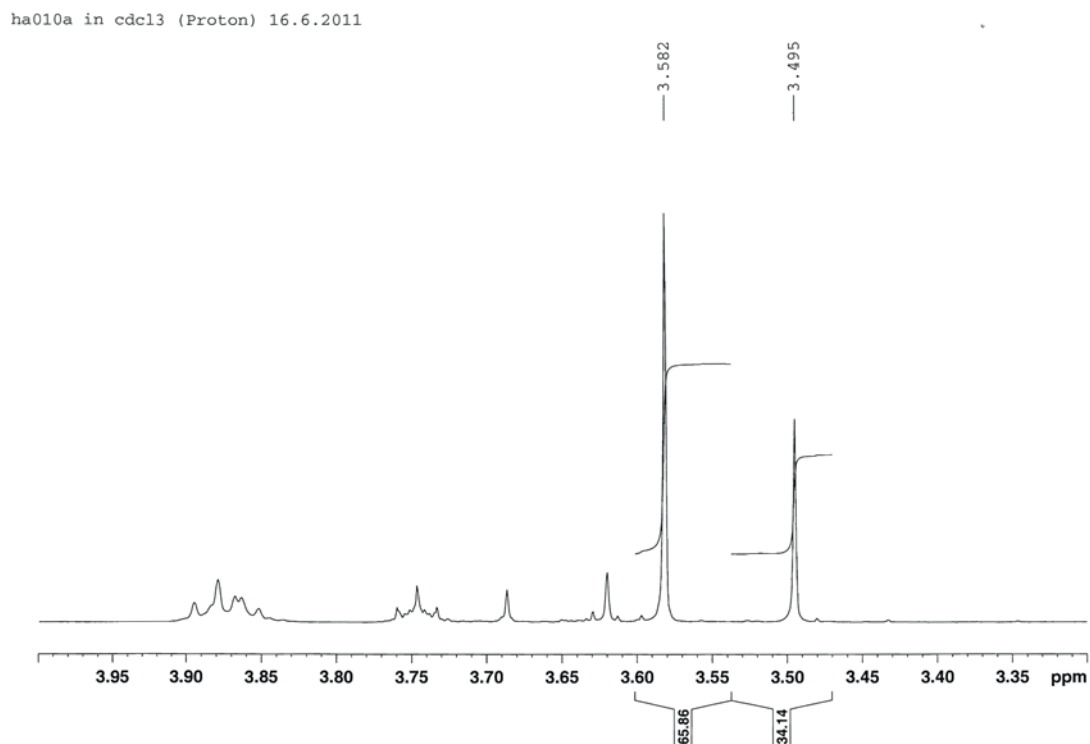
In den anfänglichen Reaktionsansätzen löste man direkt die Salze der spirocyclischen Aminosäureester in THF und epimerisierte mit 10 Äquivalenten LDA. Es stellte sich heraus, dass es vorteilhafter war, den Spirocyclus als freie Base, gelöst in THF, einzusetzen und dafür die Menge an LDA von 10 auf 3 Äquivalente zu reduzieren.

6.2.1. Epimerisierung 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat **1d**



Nachdem aus dem Salz **1dFU** durch Ausschütteln mit Natriumcarbonat der spirocyclische Aminosäureester **1d** freigesetzt war, wurde die Epimerisierung mit 3 Äquivalenten LDA in THF bewerkstelligt. Die Zugabe erfolgte bei -78 °C, anschließend wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt und 1 Stunde weitergerührt. Zur Protonierung des Enolats wurde eine 5%-ige Ammonchlorid-Lösung verwendet. Danach wurde mit einem Überschuß einer 2N Natriumcarbonat-Lösung versetzt und die Reaktionsprodukte mit Dichlormethan extrahiert.

Das Protonenresonanzspektrum des Rohproduktes zeigte neben dem bereits bekannten Signal der Methoxygruppe von **1d** bei 3.59 ppm ein zweites Signal bei 3.50 ppm, das dem gewünschten Epimerisierungsprodukt **7d** zuzuordnen war. Die Anteile der diastereomeren Ester konnte aus den Integralen dieser Schlüsselsignale ermittelt werden (**1d**:**7d** = 66:34).



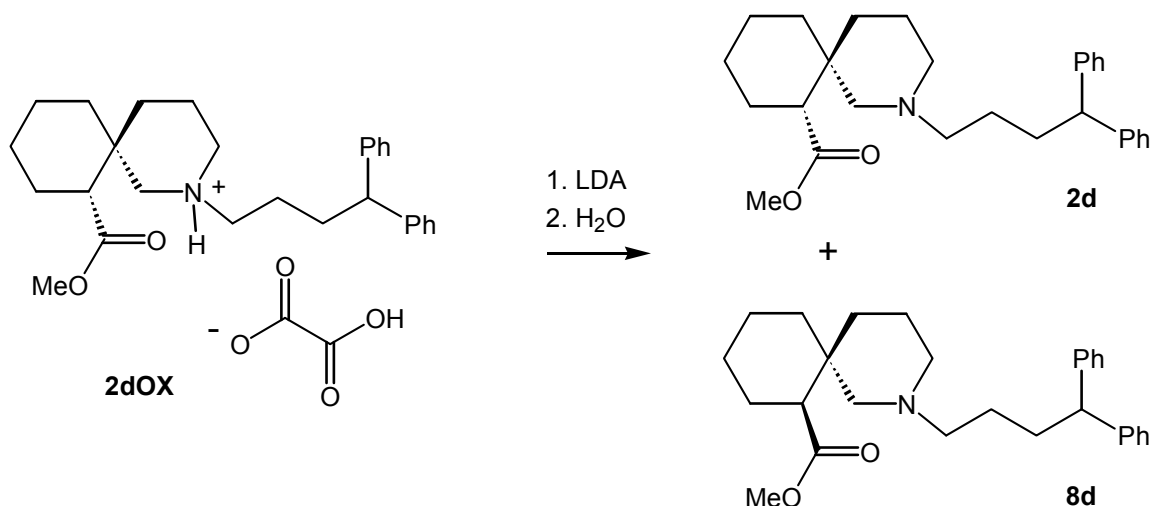
Neben der gewünschten Epimerisierung war aber auch eine Hydrolyse der spirocyclischen Ester zu beobachten. Die Ausbeute schwankte stark in Abhängigkeit von den angewandten Reaktionsbedingungen. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die Rohprodukte ^1H -NMR-spektroskopisch analysiert, wobei ein Vergleich der Signalintensitäten der aromatischen Protonen mit den Wasserstoffen der Methoxygruppe offenbarte, wie hoch der Anteil der Esterspaltung im Zuge der Epimerisierung ausgefallen war.

Die Trennung der beiden diastereomeren Ester **1d** und **7d** konnte sowohl analytisch durch Dünnschichtchromatographie als auch präparativ durch Flash-Chromatographie erreicht werden. Als stationäre Phase wurde Kieselgel und als Laufmittel PE:Et₃N = 98:2 verwendet.

Unter optimalen Bedingungen (Ansatz ha010) betrug die Ausbeute nach Flash-Chromatographie 14% für das Ausgangsprodukt **1d** und 14% für das Isomerisierungsprodukt **7d** (bezogen auf das eingesetzte Salz 1dFU).

6.2.2. Epimerisierung 2-Azaspiro[5.5]undecan-7-carboxylat **2d**

In Analogie zur oben beschriebenen Methode untersuchten wir nun auch die Epimerisierung des 2-Azaspiro[5.5]undecan-7-carboxylats **2d** mit Lithiumdiisopropylamid (= LDA). Hierzu wurde das Salz **2dOX** mit 10 Äquivalenten LDA bei -78°C umgesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Extraktion ergab das Rohprodukt in einer Ausbeute von 99 %.



Das Protonenresonanzspektrum des Rohproduktes zeigte neben dem bereits bekannten Signal der Methoxygruppe von **2d** bei 3.52 ppm ein zweites Signal bei 3.62 ppm, das dem gewünschten Epimerisierungsprodukt **8d** zuzuordnen war. Die Anteile der diastereomeren Ester konnte aus den Integralen dieser Schlüsselsignale ermittelt werden (**2d:8d** = 1:1).

6.3. Epimerisierung mit Lithium- Hexamethyldisilazan

In der Hoffnung bei der Epimerisierung der Spirocyclen bessere Ausbeuten als mit LDA zu erhalten, starteten wir Versuche mit der Base Lithium-Hexamethyl-disilazan.

Die Lithium-Hexamethyldisilazan Herstellung erfolgte durch die Zugabe von n-Butyllithium zu Hexamethyldisilazan, gelöst in THF, bei einer Temperatur von 0°C. Man arbeitete unter Argon-Atmosphäre, da die resultierende Base Lithium-Hexamethyl-disilazan feuchtigkeitsempfindlich ist. Man ließ die Reaktionsmischung 1 Stunde bei Raumtemperatur rühren. Die weitere Vorgangsweise entsprach jener mit LDA-Reagenz.

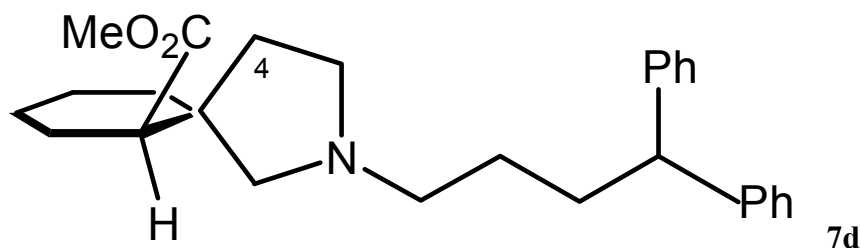
Es stellte sich jedoch heraus, dass Lithium-Hexamethyldisilazan nicht in der Lage ist, die Konfiguration am C-7 von (6*RS*,7*RS*)-Methyl-N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro[5.5]undecan-7-carboxylat (**2d**) zu verändern. Im ¹H-NMR-Spektrum konnte man nur Signale zugehörig zum Edukt **2d** nachweisen.

7. Vergleichende spektroskopische Analyse der spirocyclischen Aminosäureester **1d** und **7d**

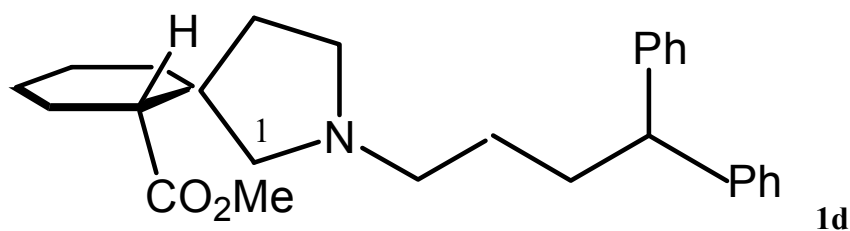
Die Protonen und Kohlenstoffresonanzspektren der Azaspiro[4.5]decane **1d** und **7d** zeigen charakteristische Signale im Aromatenbereich, die von den Phenylresten der Seitenkette stammen. Verschiebungsunterschiede werden bei diesen Gruppen allerdings nicht beobachtet, da der Abstand zu den Chiralitätszentren an den Spiroatomen zu groß ist. Die als Singulets detektierbaren Methoxygruppen der spirocyclischen Ester geben gut differenzierbare Signale, sodass hieran die Diastereomerenreinheitsanalytik festgemacht werden kann. Erschwerend für die Zuordnung der übrigen Protonensignale ist allerdings deren „glockige“ Form, welche durch die konformativ eingeschränkte Beweglichkeit der Ringe am Spirozentrum zustandekommt. Dennoch konnte die Verschiebung aller Wasserstoffe durch Auswertung der HSQC-Spektren eindeutig geklärt werden (siehe Tabelle).

Die Zuordnung der Konfiguration der diastereomeren Aminosäureester **1d** und **7d** erfolgte anhand der in den Kohlenstoffspektren deutlich beobachtbaren Verschiebungsunterschiede, die durch den gamma-gauche-Effekt hervorgerufen werden. Dieser Effekt kommt durch sterische Interaktionen sich nahestehender funktioneller Gruppen zustande, sodass eine Berührung bzw. Überlappung der van der Waals-Radien resultiert und eine Hochfeldverschiebung der betroffenen Kohlenstoffresonanzen zu beobachten ist.

Wie schon in vorangegangenen Diplomarbeiten beschrieben wurde[1;3], stehen die Ringebene des Isocyclus und des Heterocyclus orthogonal zueinander. Dadurch ergibt es sich stringent, dass bei dem Diastereomer **7d** die Carboxylgruppe am Kohlenstoff C-6 in einer Nahbeziehung zum C-4 steht, die Carboxylgruppe der Verbindung **1d** sich aber näher beim C-1 befindet.

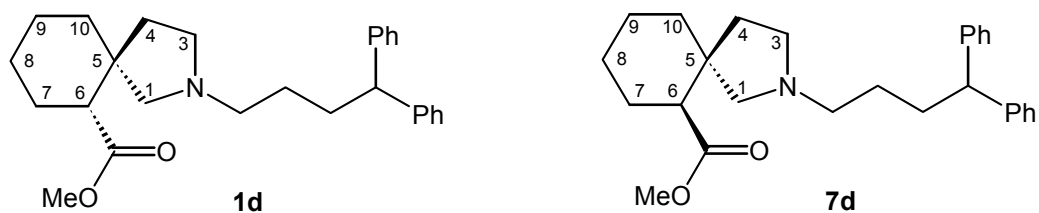


(5RS,6SR)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl- 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat



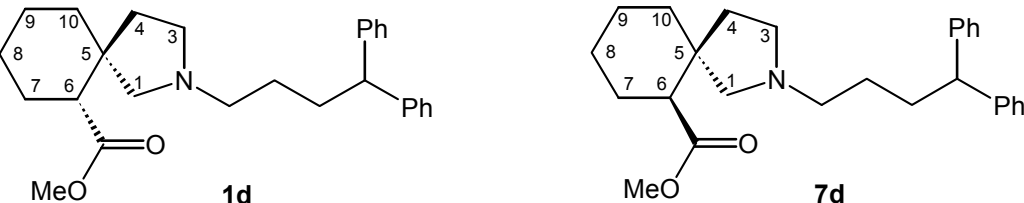
(5RS,6RS)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl- 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat

Schema 6: γ -gauche-Effekt: Räumliche Nahbeziehungen von **7d** im Vergleich zu **1d**



1d		7d
H-1	2.57	2.58
	2.37	2,04
H-3	2.50	2.52
	2.30	2.27
H-4	1.91	2.11
	1.56	1.44
H-6	2.33	2.30
H-7	1.57	1.63
	1.27	1.22
H-8	1.69	1.62
	1.63	
H-9	1.49	1.50
	1.36	1.38
H-10	1.82	1.67
	1.34	1.30
OCH ₃	3,59	3.50
H-1'	2.39	2.31
H-2'	1.44	1.39
H-3'	2.06	2.05
H-4'	3,88	3.88
Ar H-2, H-6	7.24	7.24
Ar H-3, H-5	7.26	7.26
Ar H-4	7.16	7.16

Tabelle 5: ¹H-Verschiebungen der arylalkylsubstituierten 2-Azaspiro[4.5]decane **1d** und **7d**



1d	7d	7d
C-1	61.63	66.57
C-3	53.39	54.19
C-4	37.50	31.02
C-5	43.69	44.03
C-6	50.86	50.91
C-7	23.76	24.32
C-8	26.79	26.49
C-9	23.11	22.69
C-10	38.19	38.32
COO	175.18	175.44
OCH ₃	51.26	51.09
C-1'	56.24	56.14
C-2'	27.04	27.19
C-3'	33.54	33.60
C-4'	51.26	51.29
Ar C-1	145.11	145.09
Ar C-2, C-6	127.83	127.80
Ar C-3, C-5	128.35	128.34
Ar C-4	126.01	126.00

Tabelle 6: ^{13}C -Verschiebungen der arylalkylsubstituierten 2-Azaspiro[4.5]decane **1d** und **7d**

Die im Schema 6 dargelegten räumlichen Nahbeziehungen der Substituenten in **7d** und **1d** sollten nun eine Hochfeldverschiebung des C-1 im Diastereomer **1d** und eine Hochfeldverschiebung des C-4 im Diastereomer **7d** erwarten lassen. In der Tat ergaben die experimentellen Untersuchungen die postulierten Effekte, wobei die Hochfeldverschiebung des C-1 im Diastereomer **1d** 5,0 ppm und die Hochfeldverschiebung des C-4 im Diastereomer **7d** 6,5 ppm betrugen und somit im erwarteten Bereich lagen.

Die Größe des gamma-gauche-Effekt hängt vom räumlichen Anspruch der verursachenden Gruppe ab und entspricht den bisher an spirocyclischen GABA-Analoga beobachteten Werten für Carbonsäureester.

8. Trennung epimerer spirocyclischer Aminosäureester

Eine besondere Herausforderung dieser Diplomarbeit bildete die Ausarbeitung von chromatographischen Methoden zur präparativen Trennung der epimeren spirocyclischen Aminosäureester.

Dünnschichtchromatographie:

Um ein geeignetes Laufmittel für die Flash-Chromatographie zu finden, wurde zuerst die Dünnschichtchromatographie zur Beurteilung der Möglichkeit die Diastereomeren zu trennen eingesetzt. Dabei ist zu erwähnen, dass es äußerst sinnvoll war, die DC-Folien vorher mit Triethylamin zu imprägnieren um die sauren Bindungsstellen des Kieselgels abzusättigen und somit ein starkes Tailing der basischen Substanzen zu vermeiden. Aus sehr vielen getesteten Laufmittel, konnte man nur mit dem Gemisch aus Petrolether und Triethylamin im Verhältnis PE: Et₃N = 98:2 bzw. 97:3 eine nennenswerte Auftrennung der Diastereomeren erreichen.

Laufmittel	Rf (1d)	Rf(7d)	Rf(Artefakte)
PE : Et ₃ N = 980:20	0.250	0.312	0 (Startfleck)
PE : Et ₃ N = 970:30	0.479	0.541	0 (Startfleck)

Laufmittel	Rf (2d)	Rf(8d)	Rf(Artefakte)
PE : Et ₃ N = 980:20	0.528	0.528	0 (Startfleck)
PE : Et ₃ N = 984:16	0.430	0.493	0 (Startfleck)

Tabelle7. Rf-Werte, DC-Aluminium-Folien, Kieselgel 60 F254, zuvor mit Et₃N imprägniert.

Beim Vergleich der Rf-Werte fällt die wesentlich stärkere Retention der spirocyclischen Ester **1d** und **7d** gegenüber den homologen spirocyclischen Estern **2d** und **8d** auf. Dies wird durch die unterschiedliche Basizität der Stickstoffe von 2-Azaspiro[4.5]decanen (pK = 11,2) und von 2-Azaspiro[5.5]undecanen (pK = 10,49) hervorgerufen, wodurch die Wechselwirkung mit der sauren stationären Phase Kieselgel sehr unterschiedlich ausfällt. Die unterschiedliche Basizität kann schließlich mit der geänderten sterischen Konstellation zwischen Carboxylatgruppe und basischem Stickstoff in 2-Azaspiro[4.5]decanen und 2-Azaspiro[5.5]undecanen erklärt werden [3].

Flash-Chromatographie

Die Reindarstellung der epimeren spirocyclischen Ester sollte durch präparative Flash-Chromatographie erreicht werden. Die Abtrennung der bei der Epimerisierung auftretenden Artefakte gestaltete sich relativ einfach, da große R_f -Wertunterschiede zu den Zielverbindungen bestanden. Die Wahl des Laufmittels ergab sich aus den dünnschichtchromatographischen Vorversuchen. Es wurde bei den spirocyclischen Ester **1d** und **7d** (PE:Et₃N = 980:200) ein geringfügig polareres Eluens gewählt als bei den homologen spirocyclischen Estern **2d** und **8d** (PE:Et₃N = 984:160).

Trotz der ausführlichen Voruntersuchungen entsprach das experimentell erreichbare Ergebnis nicht ganz unseren Erwartungen. Während sich die 2-Azaspiro[4.5]decane **1d** und **7d** nahezu vollständig trennen ließen und die Isolierung von Reinfractionen gelang, blieben die 2-Azaspiro[5.5]undecane **2d** und **8d** im präparativen Maßstab ungetrennt.

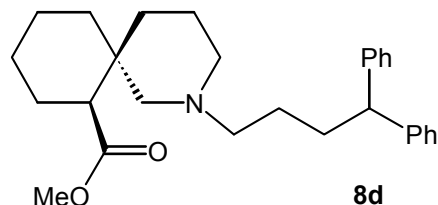
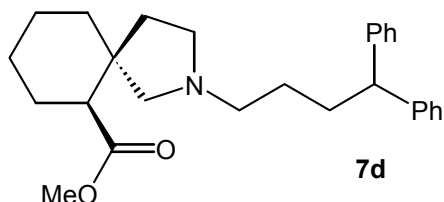
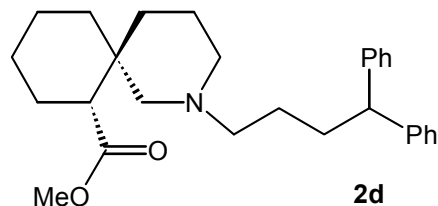
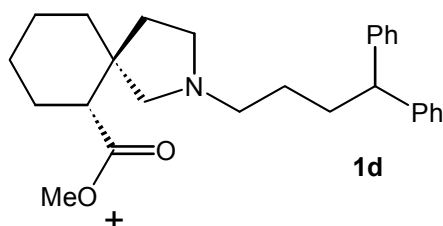
9. Herstellung des Oxalatsalzes der Zielverbindung **7d**

Bereits aus vorangegangenen Diplomarbeiten [3] liegen gute Erfahrungen über die Fumarat- und Oxalat-Salzbildung der spirocyclischen Aminosäureester mit GABA analoger Struktur vor. So war auch ein weiteres Ziel meiner Diplomarbeit das gewünschte Diastereomer als Salz zu fällen, um damit einmal biologische Testungen an den einzelnen GABA-Transportern durchführen zu können. Da frühere Diplomanden bei der Salzfällung als Oxalate bessere Ausbeuten erzielen konnten als bei der Herstellung eines Fumaratsalzes, entschieden wir uns, auch das Oxalatsalz herzustellen.

Die Base (5RS,6SR)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl-2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (**7d**), gesammelt von den einzelnen Reaktionsansätzen, wurde in Isopropanol gelöst und mit einem 1.1 molaren Überschuß an Oxalsäure in Isopropanol versetzt. Um die Kristallisation zu beschleunigen, nutzten wir ein allgemein anerkanntes Hilfsmittel und erzeugten durch das Kratzen mit einem Glasstab Impfkristalle. Zur Fällung des Salzes **7dOX** setzten wir die Lösung eine Nacht lang der tieferen Temperatur im Kühlschrank (ca. 5 °C) aus. Die entstandenen Kristalle wurden am nächsten Tag abgenutscht, mit Isopropanol gewaschen und im Exsikkator im Vakuum getrocknet. Man erhielt farblose Kristalle in einer Ausbeute von 32% bezogen auf die ursprünglich eingesetzte freie Base des spirocyclischen Aminosäureesters.

Zusammenfassung:

Ziel dieser Diplomarbeit war die Synthese der bisher nicht beschriebenen spirocyclischen GABA-Analoga **7d** und **8d**, die für eine subtypspezifische Testung an GABA-Transportern bereitgestellt werden sollten. Als Ausgangsmaterial diente das 2-Azaspiro[4.5]decan **1d** und das 2-Azaspiro[5.5]undecan **2d**. Beide Verbindungen waren in Form der Oxalate bzw. Fumarate im Arbeitskreis vorhanden.



Zur Epimerisierung wurde mit starken Basen zum Enolat deprotoniert und anschließend im Zuge der wässrigen Aufarbeitung wieder reprotoniert. Die mit dieser Methode umgesetzten spirocyclischen Aminosäureester lieferten Diastereomeregemische, wobei das Verhältnis der Epimeren bei den 2-Azaspiro[4.5]decanen **1d** und **7d** 66:34 und bei den homologen 2-Azaspiro[5.5]undecanen **2d** und **8d** 50:50 betrug.

Die Trennung der beiden diastereomeren Ester **1d** und **7d** konnte sowohl analytisch durch Dünnschichtchromatographie als auch präparativ durch Flash-Chromatographie erreicht werden. Als stationäre Phase wurde Kieselgel und als Laufmittel PE:Et₃N = 98:2 verwendet. Im Gegensatz dazu blieben die 2-Azaspiro[5.5]undecane **2d** und **8d** trotz umfangreicher Voruntersuchungen (DC) im präparativen Maßstab ungetrennt.

Die Zuordnung der Konfiguration der diastereomeren Aminosäureester **1d** und **7d** erfolgte anhand der in den Kohlenstoffspektren deutlich beobachtbaren Verschiebungsunterschiede, die durch den gamma-gauche-Effekt hervorgerufen werden. Erwartungsgemäß zeigte sich im Diastereomer **1d** eine Hochfeldverschiebung des C-1 (5,0 ppm) und im Diastereomer **7d** eine Hochfeldverschiebung des C-4 (6,5 ppm) aufgrund der Nahbeziehungen zur Estercarboxylgruppe.

Schlussendlich wurde die Zielverbindung **7d** in das Oxalat überführt, durch Kristallisation gereinigt und für die Testung bereitgestellt.

Experimenteller Teil

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Avance 500 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Die Eichung der ppm-Skala für die NMR-Spektren erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals für CHCl_3 [$\delta(^1\text{H}) = 7.26 \text{ ppm}$] bzw. CDCl_3 [$\delta(^{13}\text{C}) = 77.00 \text{ ppm}$].

Für die Flash-Chromatographie wurde Kieselgel der Firma Merck (Si 60, 40 - 63 μm) eingesetzt. Ein Teil des Sorbens wurde in fünf Teilen Laufmittel suspendiert, in die Säule eingebracht und solange Laufmittel durch die Säule gepresst (ungefähr 0.5 bar), bis die Packung luftblasenfrei war.

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Fertigfolien der Firma Merck verwendet. Die Folien wurden immer vor dem Auftragen der jeweiligen Substanzen mit Triethylamin imprägniert.

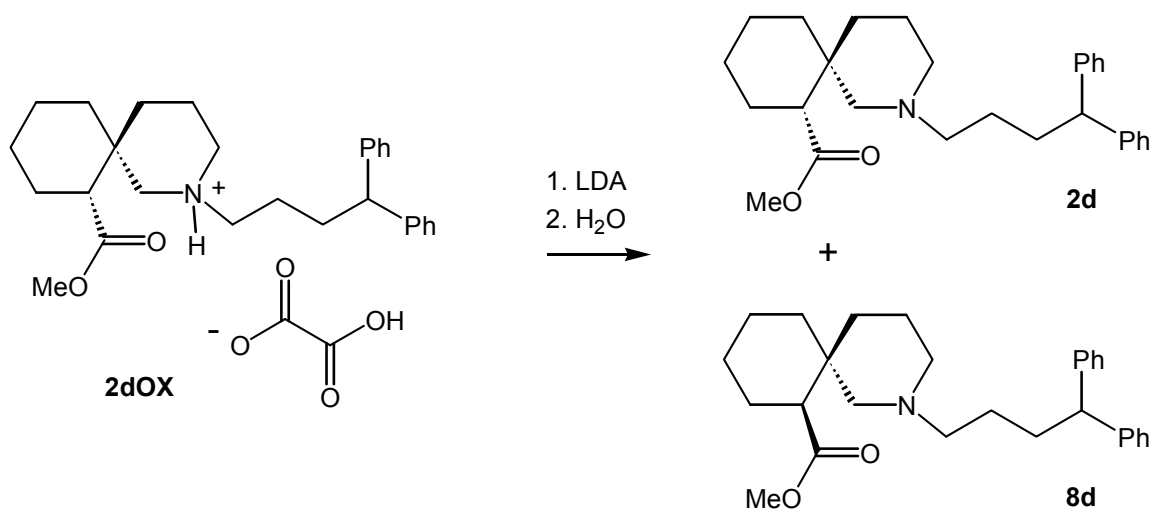
Das Lösungsmittel Tetrahydrofuran wurde mit Natrium getrocknet und stets frisch destilliert verwendet. Als Indikator für die Wasserfreiheit wurde Benzophenon zugesetzt.

Diisopropylamin wurde mit KOH getrocknet und ebenfalls stets frisch destilliert.

Die in Klammern genannten Reaktionsnummern (*ha0X*) sollen das Auffinden der entsprechenden Reaktionen in meinem Laborjournal erleichtern.

Das Kühlen der Reaktionsmischung auf -78°C erfolgte durch das Benutzen eines Kühlbades, das durch Lösen von Trockeneis (festes Kohlenstoffdioxid) in Aceton hergestellt wurde.

Epimerisierung von **2dOX** mit LDA: (Ansatz ha05a)



Herstellung von LDA

In einem mit Argon gefüllten Kolben wird Diisopropylamin (1,45 ml; 10,34 mmol; $\rho=0,722$ g/ml) in 2 ml THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend fügt man tropfenweise n-BuLi (2,5 M Lösung in Hexan; 9,48 mmol, 3,79 ml) hinzu und rührt die Reaktionsmischung 15 min bei 0°C.

Epimerisierung

Das Salz **2dOX**·H₂O (0.500g; 0.948 mmol) wird in 35ml getrocknetem Tetrahydrofuran unter Argon gelöst und auf -78°C gekühlt. Nach Erreichen der entsprechenden Temperatur wird die frisch bereitete LDA-Lösung mittels Nadelheber zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach Beenden der Zugabe wird das Kühlbad entfernt und 1 h bei Raumtemperatur rühren gelassen.

Die Reaktionsmischung wird mit 2N Na₂CO₃-Lösung (20ml) alkalisiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan (2x 20ml) extrahiert. Die gesammelte organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel Dichlormethan bei verminderten Druck abrotiert.

Man erhält eine Mischung der beiden Diastereomeren (**2d**:**8d** = 1:1, 0,394 g, 0.744 mmol, 99%), als braunes Öl.

Versuch zur präparativen Trennung von **2d** und **8d** mittels Flash-Chromatographie:

Säule: 50 g Kieselgel 60

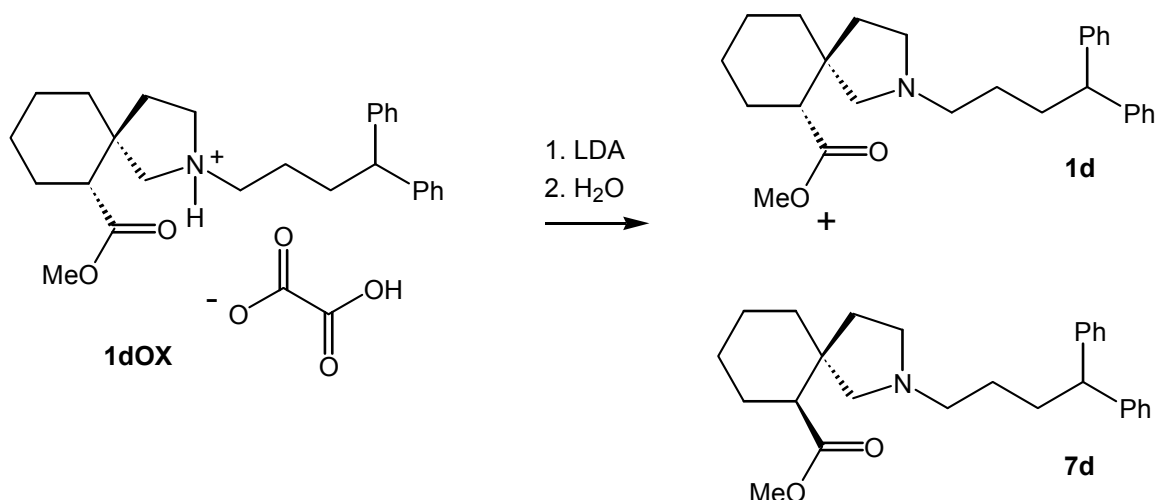
Eluens: Petrolether:Triethylamin= 984:16

Fraktionsgröße: 100 ml

Rohgemisch:	390 mg (2d:8d = 1:1, ¹ H-NMR)
Fraktion 14-17: (= <i>ha05b</i>)	221 mg (2d:8d = 1:1, ¹ H-NMR, 56% bezogen auf 2dOX)
Fraktion 20-27: (= <i>ha05c</i>)*	165 mg (Artefakte, ¹ H-NMR)

* Elution mit Dichlormethan :Et₃N = 95:5

Epimerisierung von **1dOX** mit LDA: (Ansatz ha006a)



Herstellung von LDA

In einem mit Argon gefüllten Kolben wird Diisopropylamin (1,49 ml; 10,61 mmol; $\rho=0,722$ g/ml) in 2,2 ml THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend fügt man tropfenweise n-BuLi (2,5 M Lösung in Hexan; 9,734 mmol, 3,89 ml) hinzu und rührt die Reaktionmischung 15 min bei 0°C.

Epimerisierung

Die freie Base **1dOX**·H₂O (0.500g; 0.973 mmol) wird in 25ml getrocknetem Tetrahydrofuran unter Argon gelöst und auf -78°C gekühlt. Nach Erreichen der entsprechenden Temperatur wird die frisch bereitete LDA-Lösung mittels Nadelheber zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach Beenden der Zugabe wird das Kühlbad entfernt und 1 h bei Raumtemperatur rühren gelassen.

Die Reaktionsmischung wird mit 2N Na₂CO₃-Lösung (20ml) alkalisiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan (2x 20ml) extrahiert. Die gesammelte organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel Dichlormethan bei verminderten Druck abrotiert.

Man erhält eine Mischung der beiden Diastereomeren (**1d**:**7d** = 60:40, 0,387 g, roh-AB = 98%), als braunes Öl.

Präparative Trennung der Diastereomeren **1d** und **7d** mittels Flash-Chromatographie:

Säule: 50 g Kieselgel 60

Eluens: Petrolether:Triethylamin= 98:2

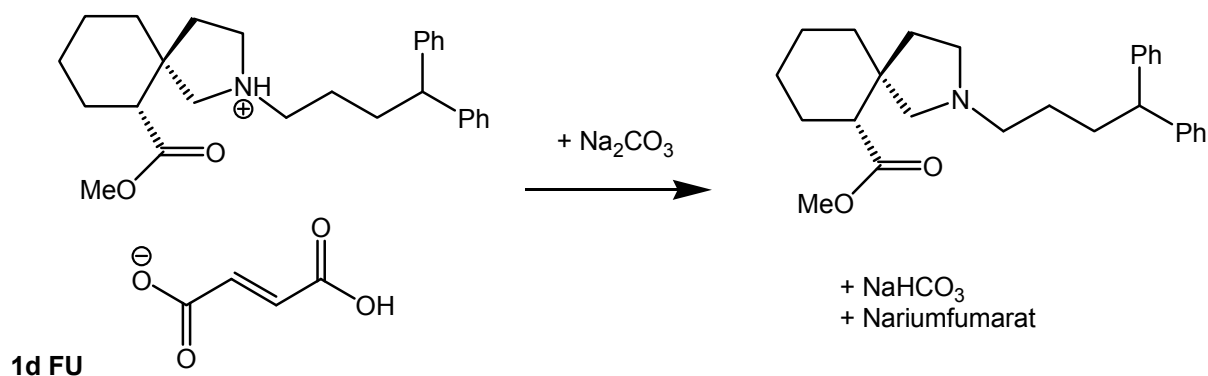
Fraktionsgröße: 100 ml

Rohgemisch:	360.2 mg (1d:7d = 60:40, ¹ H-NMR)
Fraktion 18-22: (=ha006b)	39,0 mg 1d:7d = 15:85 (¹ H-NMR, 11% bezogen auf 1dOX)
Fraktion 24-32: (=ha006c)	63,0 mg 1d (¹ H-NMR, 18% bezogen auf 1dOX)
Fraktion 40-50: (=ha006d)*	154,0 mg Artefakte, (¹ H-NMR)

* Elution mit Dichlormethan :Et₃N = 95:5

(5*RS*,6*RS*)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl-2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (**1d**)

*Freisetzung der Base aus dem Fumarat **1dFU** (Ansatz ha009)*

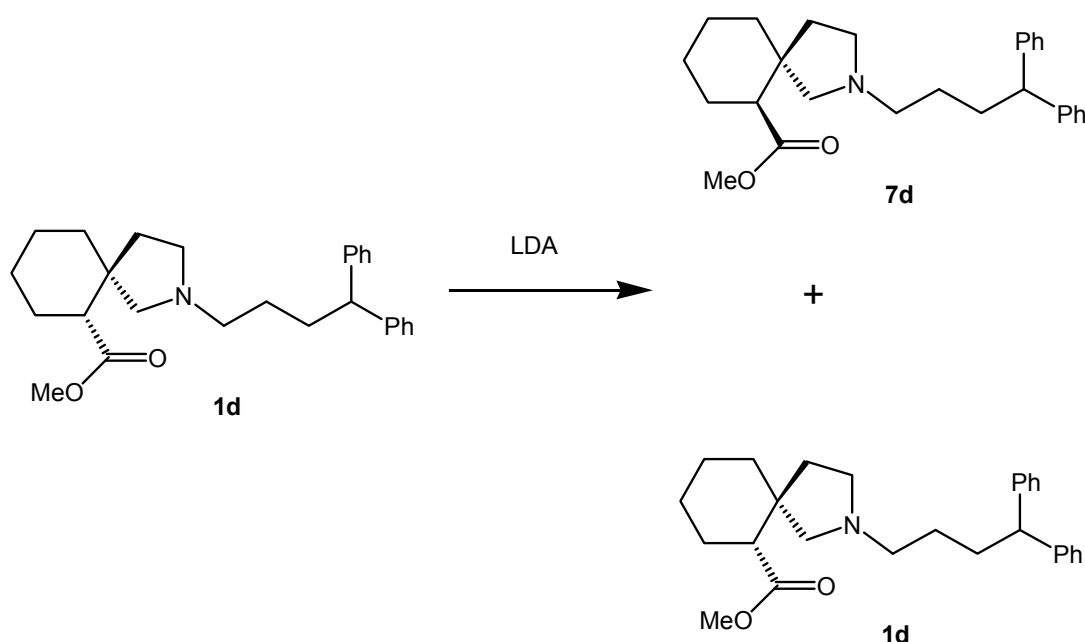


Das Salz **1dFU** (500,2 mg, 1,00 mmol) wird in 20 ml Dichlormethan gelöst und zweimal mit 10 ml 2N Na_2CO_3 -Lösung gewaschen. Die Dichlormethanphase wird mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend mit dem Rotavapor eingedampft.

Man erhält ein farbloses-beiges Öl (339 mg; 0,840 mmol, 84%).

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 7.33 - 7.08 (m, 10H, Aromaten H), 3.88 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 2.54 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-1), 2.51 - 2.20 (m, 6H, H-1, H-3, H-6, H-1'), 2.14 - 1.74 (m, 4H), 1.73 - 1.25 (m, 10H).

Epimerisierung von **1d** mit LDA: (Ansatz ha010a)



Herstellung von LDA

In einem mit Argon gefüllten Kolben wird Diisopropylamin (0,39 ml; 2,75 mmol; $\rho=0,722$ g/ml) in 2 ml THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend fügt man tropfenweise n-BuLi (2,5 M Lösung in Hexan; 2,521 mmol, 1,01 ml) hinzu und rührt die Reaktionsmischung 15 min bei 0°C.

Epimerisierung

Die freie Base **1d** (0.339g; 0.840 mmol) wird in 15ml getrocknetem Tetrahydrofuran unter Argon gelöst und auf -78°C gekühlt. Nach Erreichen der entsprechenden Temperatur wird die frisch bereitete LDA-Lösung mittels Nadelheber zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach Beenden der Zugabe wird das Kühlbad entfernt und 1 h bei Raumtemperatur rühren gelassen.

Dann wird die gesamte Reaktionslösung zu einer Ammonchloridlösung (5%, 20ml) getropft.

Die Reaktionsmischung wird mit 2N Na₂CO₃-Lösung (20ml) alkalisiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase nochmals mit Dichlormethan (2x 20ml) extrahiert. Die gesammelte organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel Dichlormethan bei verminderten Druck abrotiert.

Man erhält eine Mischung der beiden Diastereomeren (**1d**:**7d** = 66:34, 0,302g, 0.744 mmol, roh-AB = 74%), als braunes Öl.

Präparative Trennung der Diastereomeren **1d** und **7d** mittels Flash-Chromatographie:

Säule: 50 g Kieselgel 60

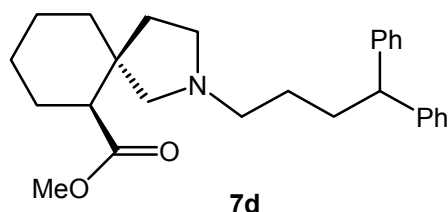
Eluens: Petrolether:Triethylamin= 98:2

Fraktionsgröße: 100 ml

Rohgemisch:	280mg (1d : 7d = 66:34, ¹ H-NMR)
Fraktion 18-24: (=ha010b)	52,0 mg 7d (¹ H-NMR, 14% bezogen auf 1dFU)
Fraktion 25-29: (=ha010x)	53,0 mg Mischfraktion(1d + 7d)
Fraktion 30-36: (=ha010c)	50,9 mg 1d (¹ H-NMR, 14% bezogen auf 1dFU)
Fraktion 44-49: (=ha010d)*	121 mg Artefakte, (¹ H-NMR)

* Elution mit Dichlormethan :Et₃N = 95:5,

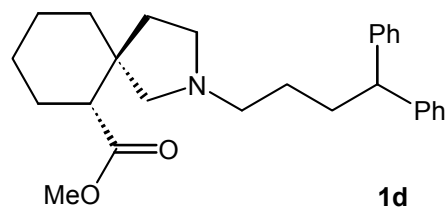
(5*SR*,6*SR*)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl- 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (7d)



^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7,26 (m, 4H, Ar H-3, H-5), 7,24 (m, 4H, Ar H-2, H-6), 7,16 (m, 2H, Ar H-4), 3,88 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 4'-H), 3,50 (s, 3H, OCH_3), 2,58 (m, 1H, H-1), 2,52 (m, 1H, H-3), 2,04 (m, 1H, H-1), 2,31 (m, 2H, H-1'), 2,30 (m, 1H, H-6), 2,27 (m, 1H, H-3), 2,05 (m, 2H, H-3'), 2,11 (m, 1H, H-4), 1,67 (m, 1H, H-10), 1,62 (m, 2H, H-8), 1,44 (m, 1H, H-4), 1,63 (m, 1H, H-7), 1,50 (m, 1H, H-9), 1,39 (m, 2H, H-2'), 1,38 (m, 1H, H-9), 1,30 (m, 1H, H-10), 1,22 (m, 1H, H-7).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 175,44(COO), 145,09 (Ar C-1), 128,34 (Ar C-3, C-5), 127,80 (Ar C-2, C-6), 126,00 (Ar C-4), 66,57 (C-1), 56,14 (C-1'), 54,19 (C-3), 51,29 (C-4'), 51,09 (OMe), 50,91 (C-6), 44,03 (C-5), 38,32 (C-10), 33,60 (C-3'), 31,02 (C-4), 27,19 (C-2'), 26,49 (C-8), 24,32 (C-7), 22,169 (C-9).

(5*RS*,6*RS*)-Methyl-N-4,4-Diphenylbutyl- 2-Azaspiro[4.5]decan-6-carboxylat (1d)

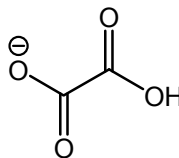
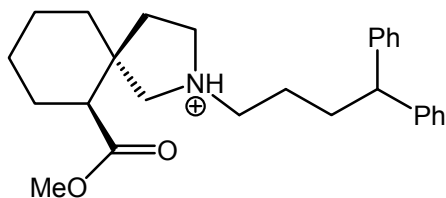


^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7,26 (m, 4H, Ar H-3, H-5), 7,24 (m, 4H, Ar H-2, H-6), 7,16 (m, 2H, Ar H-4), 3,88 (t, J = 7.9 Hz, 1H, 4'-H), 3,59 (s, 3H, OCH_3), 2,57 (m, 1H, H-1), 2,50 (m, 1H, H-3), 2,37 (m, 1H, H-1), 2,39 (m, 2H, H-1'), 2,33 (m, 1H, H-6), 2,30 (m, 1H, H-3), 2,06 (m, 2H, H-3'), 1,91 (m, 1H, H-4), 1,82 (m, 1H, H-10), 1,69 (m, 1H, H-8), 1,63 (m, 2H, H-8), 1,56 (m, 1H, H-4), 1,56 (m, 1H, H-7), 1,49 (m, 1H, H-9), 1,44 (m, 2H, H-2'), 1,36 (m, 1H, H-9), 1,34 (m, 1H, H-10), 1,27 (m, 1H, H-7).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 175,18 (COO), 145,11 (Ar C-1), 128,35 (Ar C-3, C-5), 127,83 (Ar C-2, C-6), 126,01 (Ar C-4), 61,63 (C-1), 56,24 (C-1'), 53,39 (C-3), 51,26 (C-4'), OMe), 50,86 (C-6), 43,69 (C-5), 38,19 (C-10), 37,50 (C-4), 33,54 (C-3'), 27,04 (C-2'), 26,79 (C-8), 23,76 (C-7), 23,11 (C-9).

Herstellung des Oxalates **7dOX**

(5R,6S)-Methyl N-(4,4-Diphenylbutyl)-2-azaspiro-[4.5]decan-6-carboxylat-oxalat (**7dOX**)



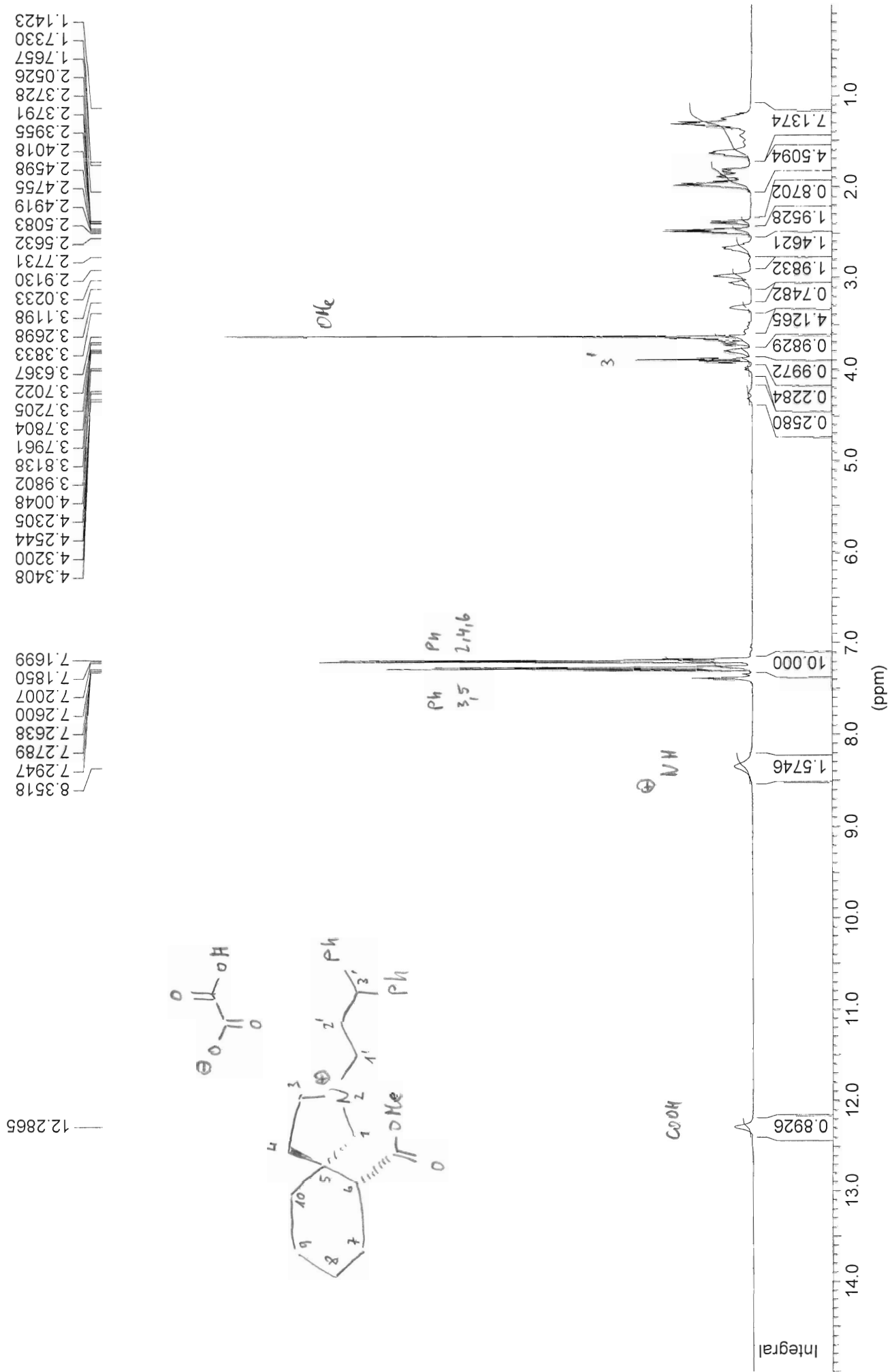
MG=495,59

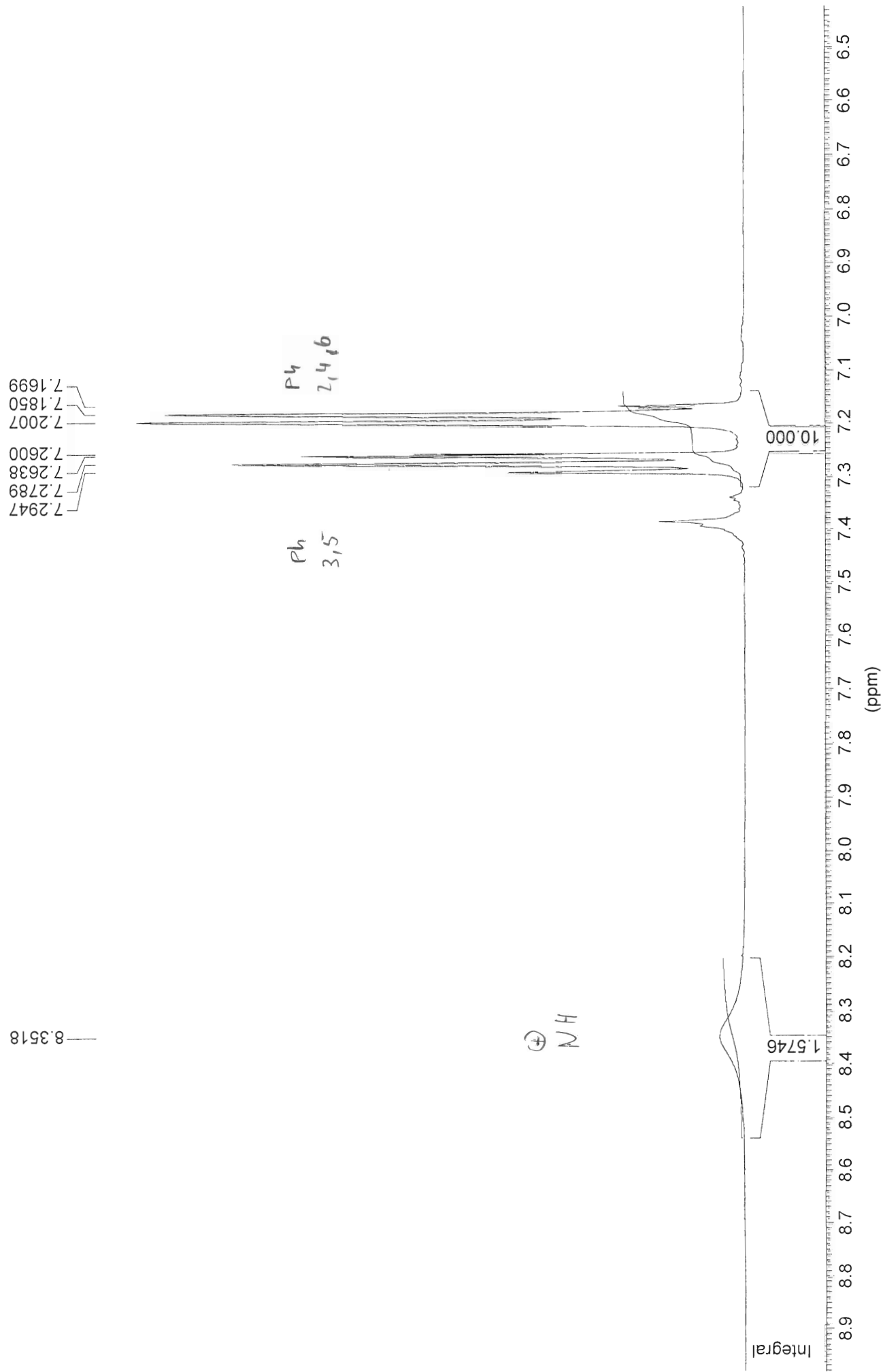
Der spirocyclische Aminosäureester **7d** (67mg; 0.165mmol) wird in 0,15ml Isopropanol durch leichtes Erwärmen gelöst und anschließend mit einem 1,1 molaren Überschuss an Oxalsäure (entspricht 22.9 mg Oxalsäuredihydrat, 0,1815mmol), gelöst in 0,13ml Isopropanol, versetzt. Man kratzt mit einem Glasstab am Kolben um Impfkristalle zu erzeugen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur stellt man die Lösung noch über Nacht in den Kühlschrank. Die sich gebildeten Kristalle werden abgenutscht, mit Isopropanol gewaschen und unter Vakuum in einem Exsikkator getrocknet.

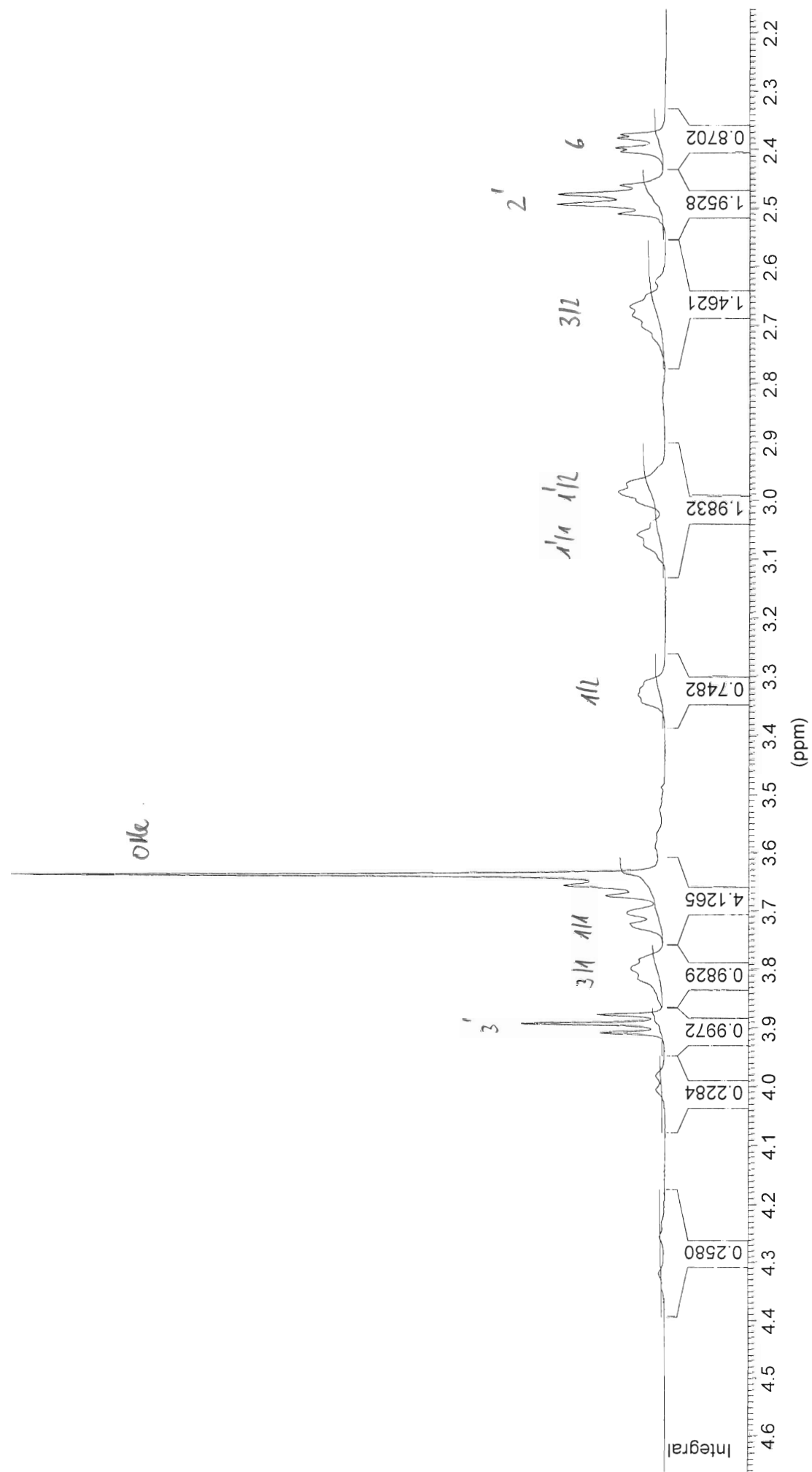
Man erhält **7dOX** (25mg, 0.05 mmol, 32%) als farblose Kristalle und nach dem Eindampfen der Mutterlauge eine öligen Rückstand (45mg).

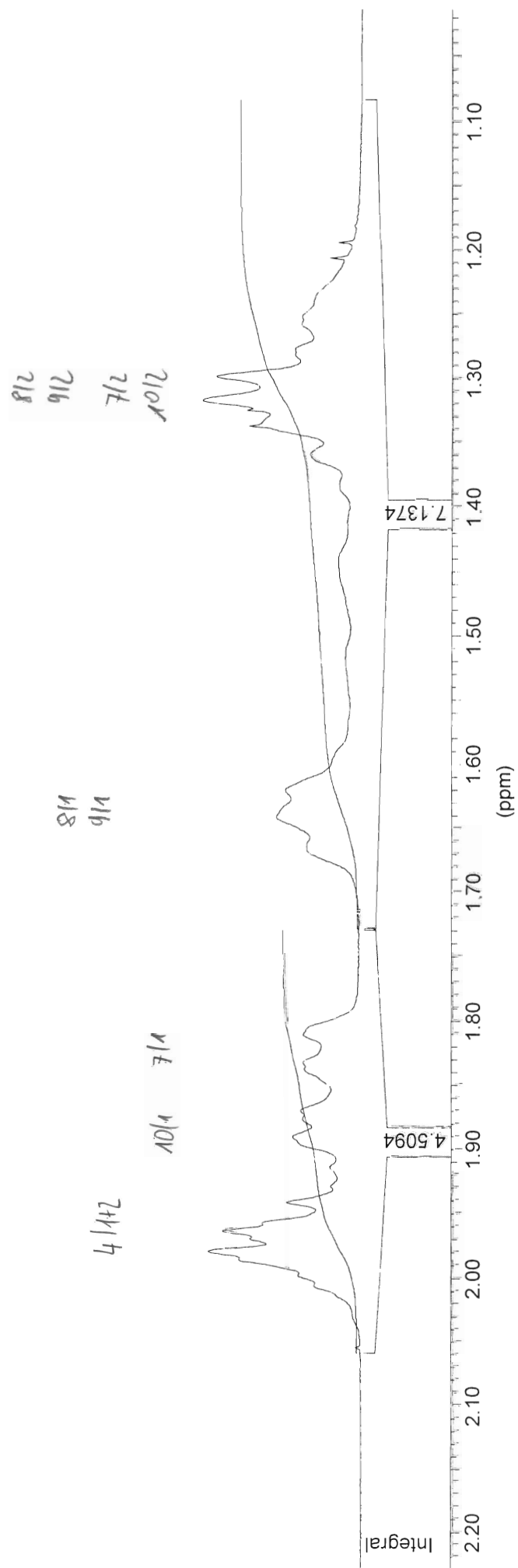
Literaturzitate

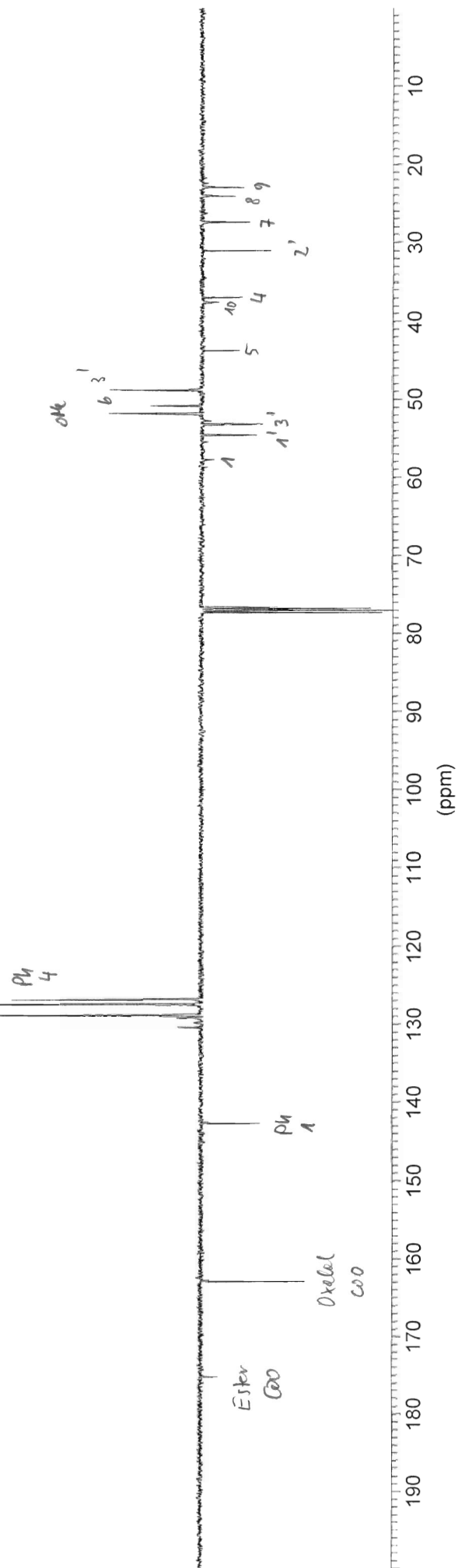
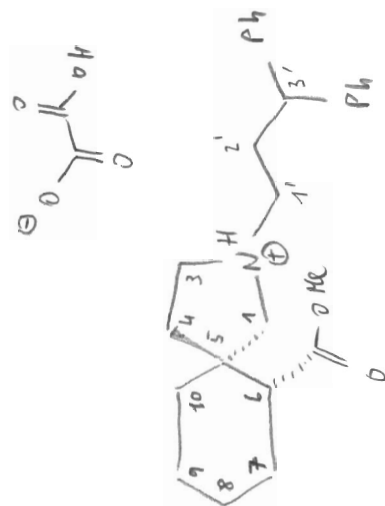
- 1 I. Langhammer; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1999*
- 2 M. Gabriel; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1998.*
- 3 T. Gruber; *Diplomarbeit, Universität Wien, 2002*
- 4 Heftberger, P.; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1999.*
- 5 S. Lauritz; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1990*
- 6 S. Lauritz; *Dissertation, Universität Wien, 1992*
- 7 W. Fischill; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1992*
- 8 G. Hollauf; *Dissertation, Universität Wien, 1994*
- 9 I. Wagner-Löffler; *Diplomarbeit, Universität Wien, 1996*
- 10 M. Kapl; *Diplomarbeit, Universität Wien, 2000*
- 11 K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2009*
- 12 K. Madsen, H. S. White, R. P. Clausen, B. Frølund, M. Larsson, P. Krogsgaard-Larsen, A. Schousboe; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, *Functional and Pharmacological Aspects of GABA Transporters 2006*
- 13 K. Madsen, R. Clausen, Orla Larsson, P. Krogsgaard-Larsen, A. Schousboe and H.S. White *Journal of Neurochemistry 2009*, 109, 139-144, *Synaptic and extrasynaptic GABA transporters as targets for anti-epileptic drugs*
- 14 K. Madsen, R. Clausen, Orla Larsson, P. Krogsgaard-Larsen, A. Schousboe and H.S. White, *Advances in Pharmacology Vol. 54, 2006 "Structure-Activity Relationship and Pharmacology of γ -Aminobutyric Acid Transport"*
- 15 C. Tanaka, N. G. Bowery; Birkhäuser Verlag ; *GABA: Receptors, Transporters and Metabolism (Advances in Pharmacological Sciences); 1995*
- 16 J. M. Tepper, E. D. Abercrombie und J. P. Bolam; Elsevier Science & Technology; *Gaba and the Basal Ganglia: 160 (Progress in Brain Research); 2007*
- 17 S. C. Gad und J. Wiley & Sons; *Drug Discovery Handbook; 2005*
- 18 F. Holsboer, G. Gründer und O. Benkert; *Handbuch der Psychopharmakotherapie; 2007*
- 19 T. Bajorat und T. Brandenburger; Thieme; *Fallbuch Biochemie 2006*
- 20 H. Förstl, M. Hautzinger und G. Roth; Springer Berlin Heidelberg; *Neurobiologie psychischer Störungen; 2005*
- 21 D. K. Binder und H. E. Scharfman; Springer US ; *Recent Advances in Epilepsy Research (Advances in Experimental Medicine and Biology); 2004*
- 22 W. Fleischhacker, S. Lauritz, E. Urban, P. Baumann, H. Bittiger, *Eur. J. Med. Chem. 1995*, 30, 707-713
- 23 M.E. A. Reith; Humana Press; *Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation (Contemporary Neuroscience); 2002*
- 24 Xiao-Tao Jin, Jean-F. Pare' and Y. Smith; *European Journal of Neuroscience 2011*, Vol. 33, pp. 1504–1518, *"Differential localization and function of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the rat globus pallidus"*
- 25 L. A. Borden; *Neurochem. Int. Vol. 29, No. 4, pp. 335–356, 1997; "GABA Transporter Heterogeneity: Pharmacology and cellular localization"; 1996*

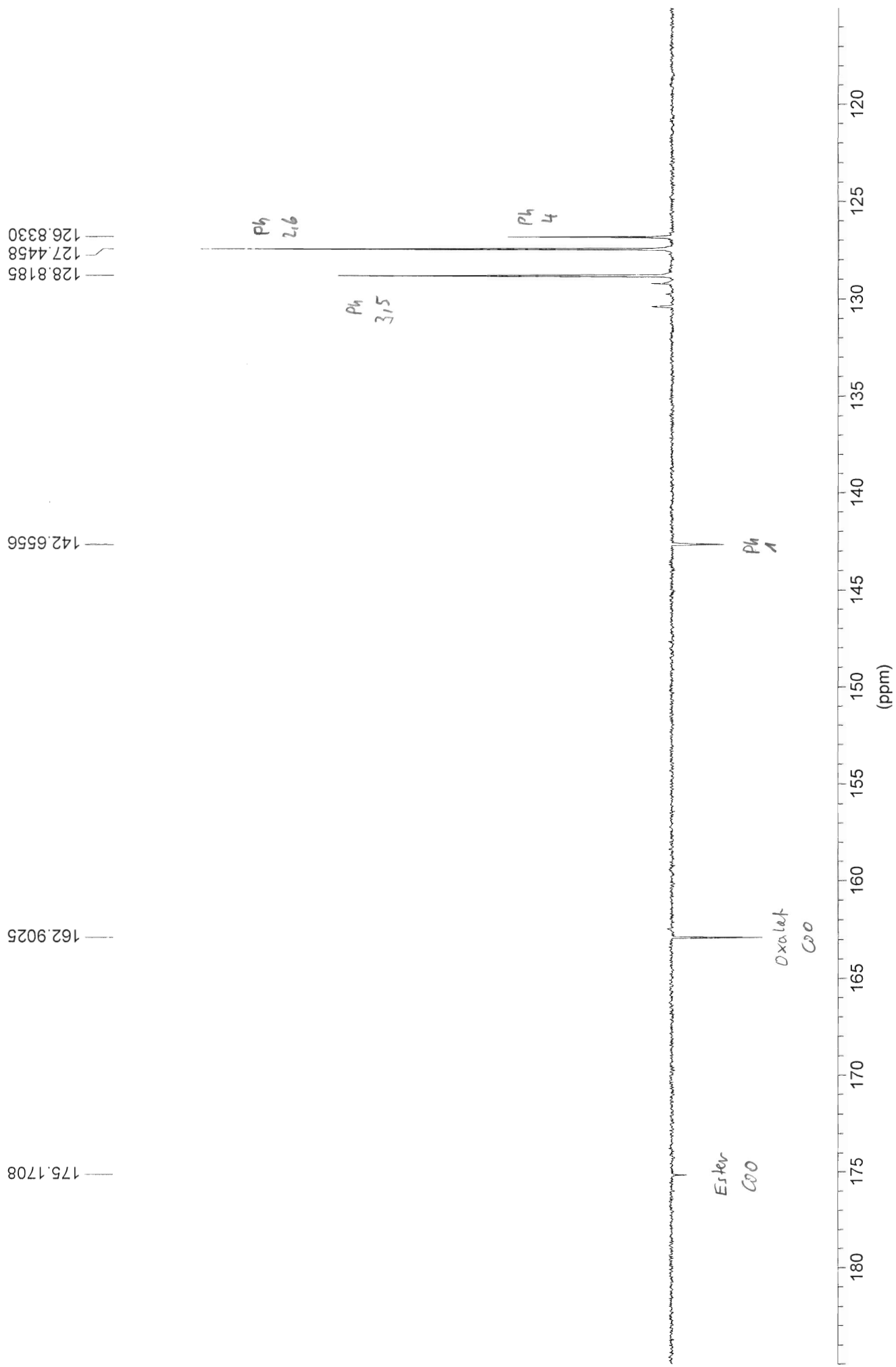


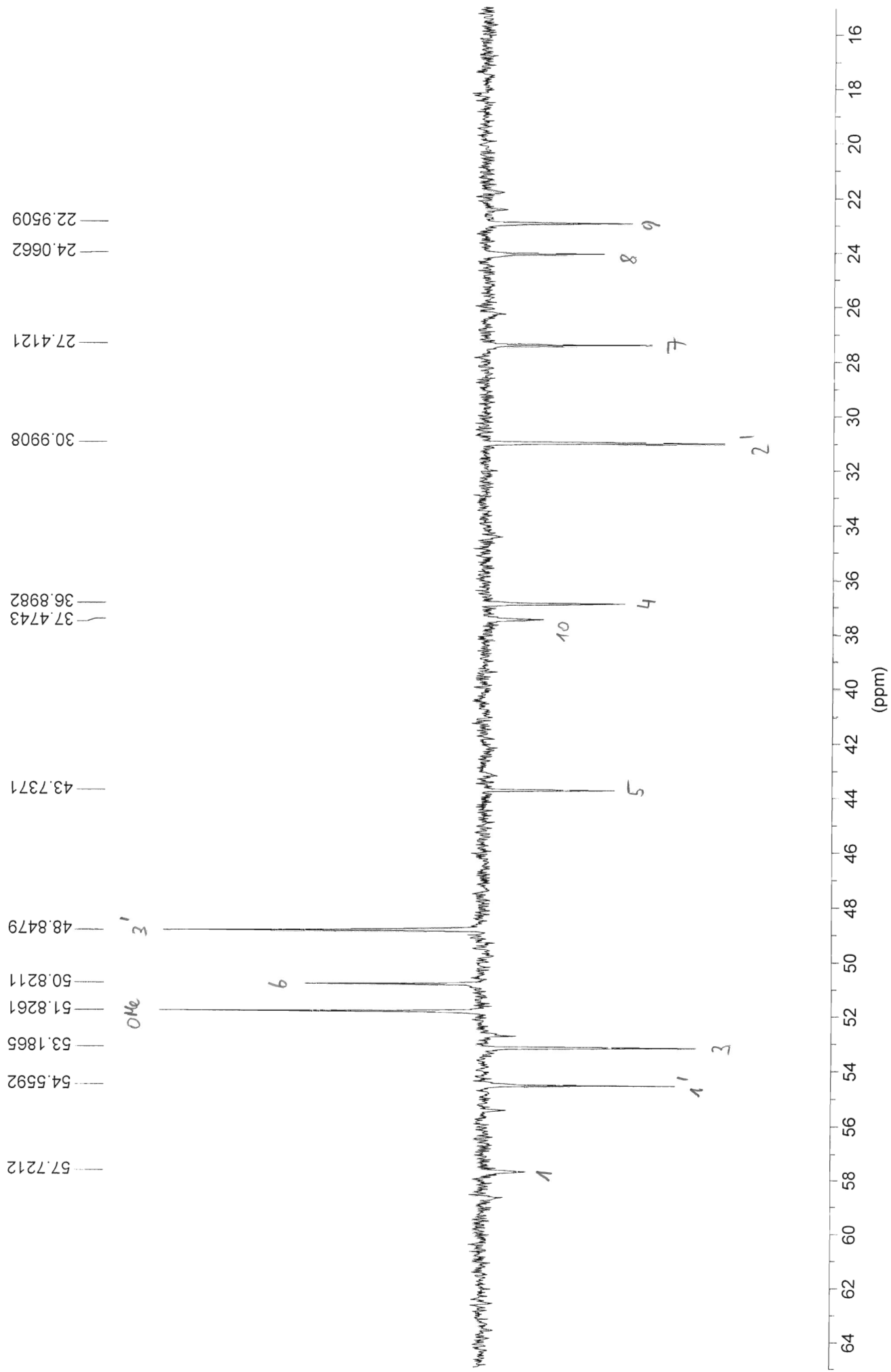




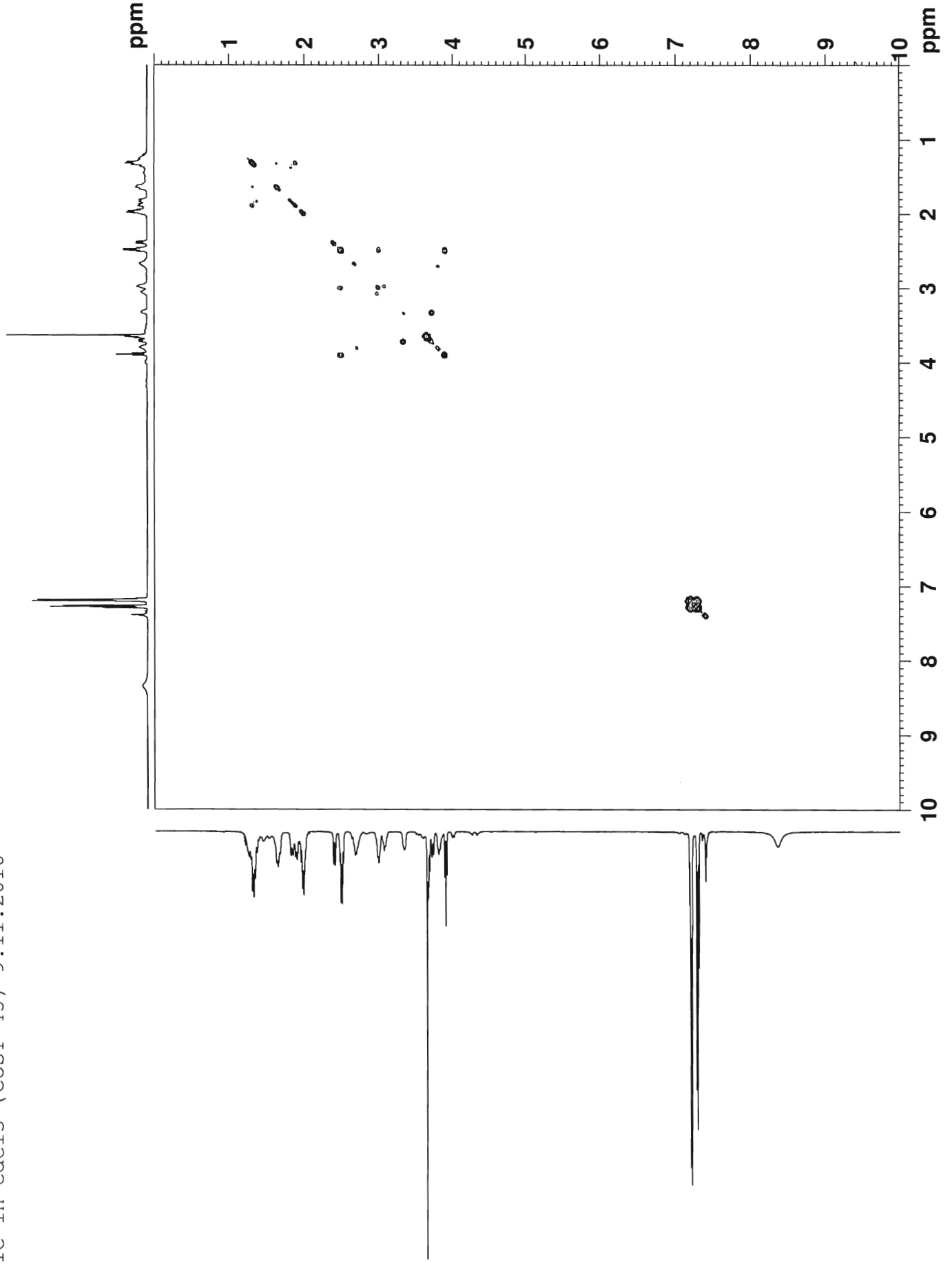


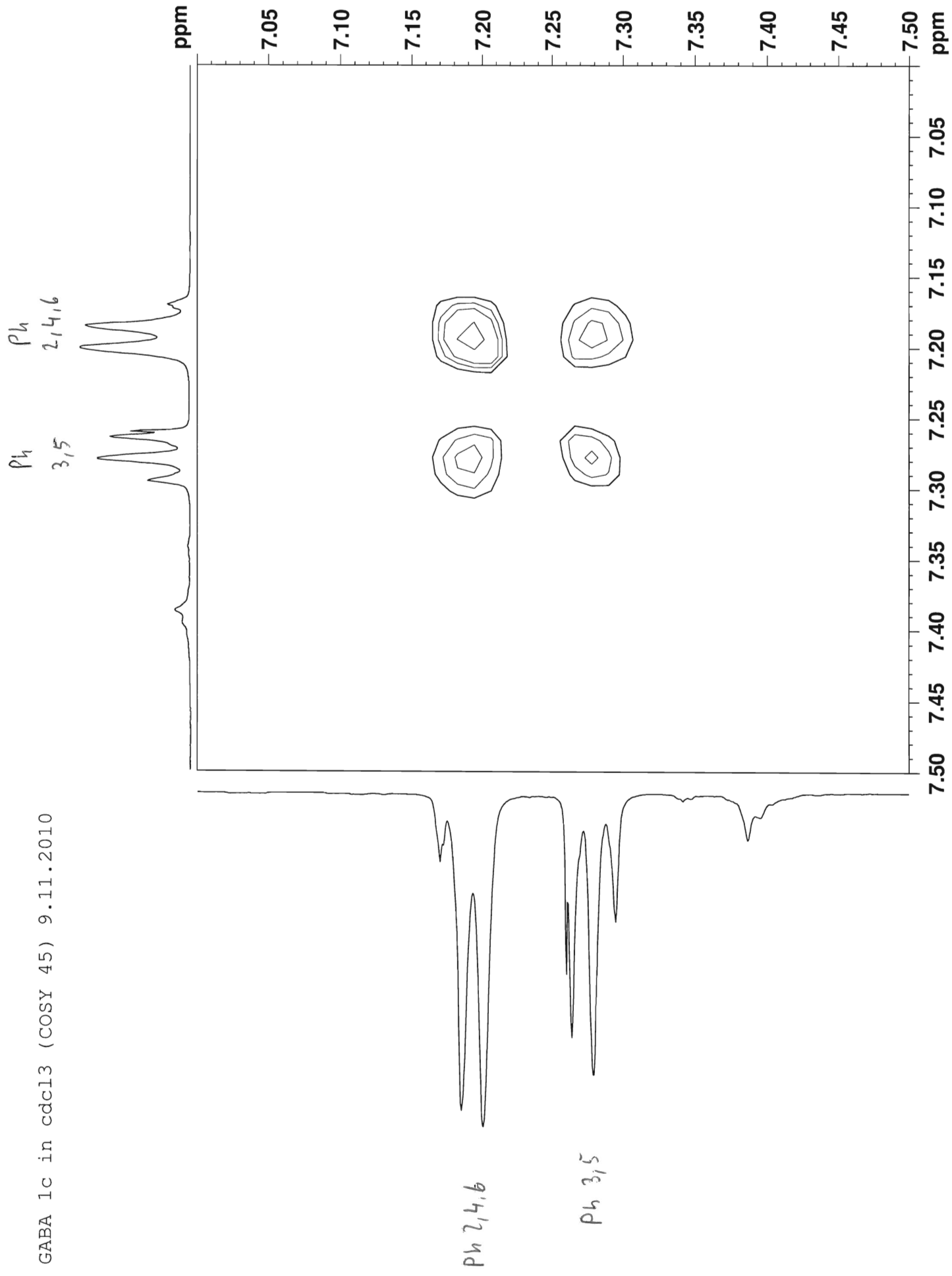




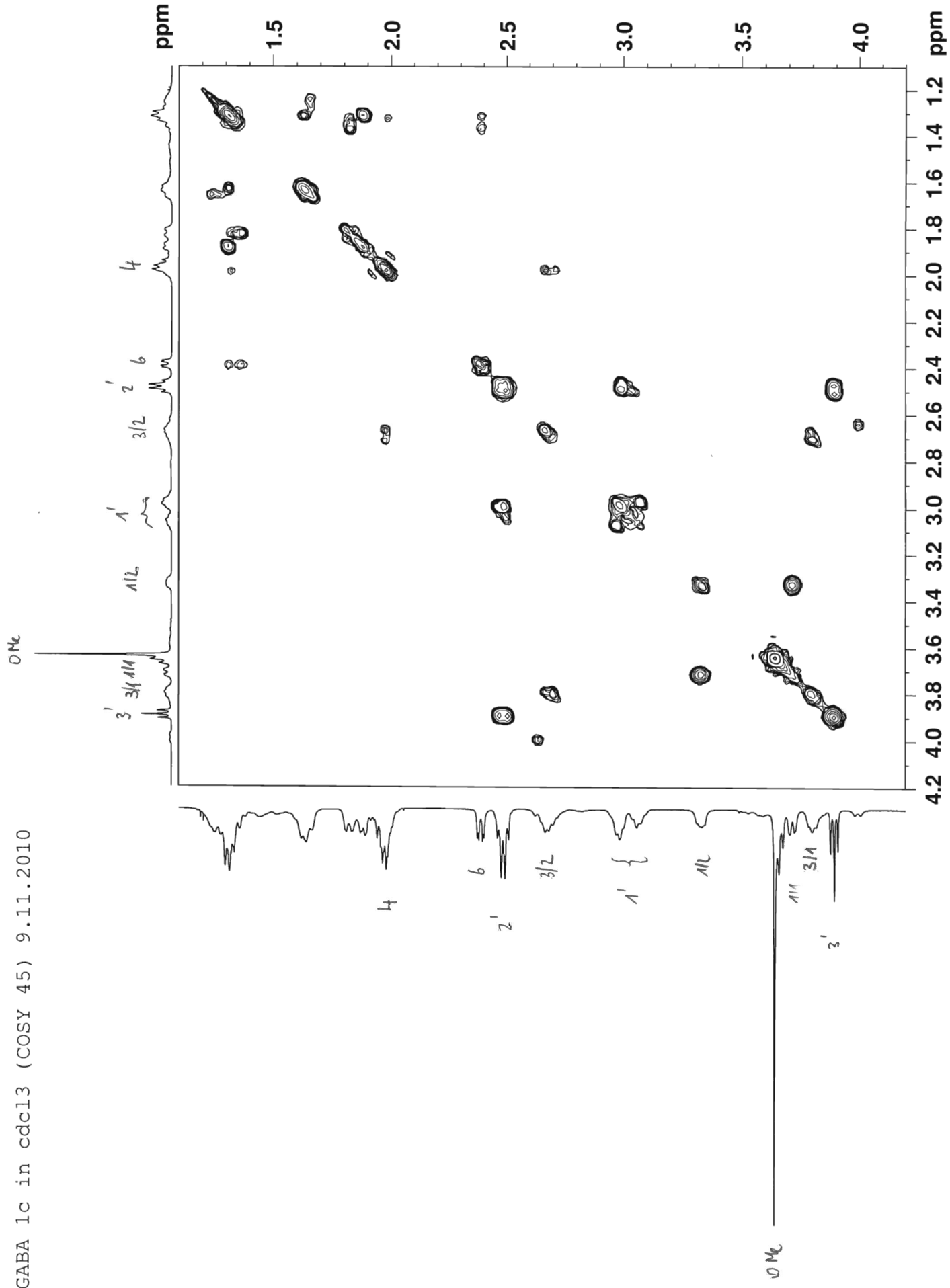


GABA 1c in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010

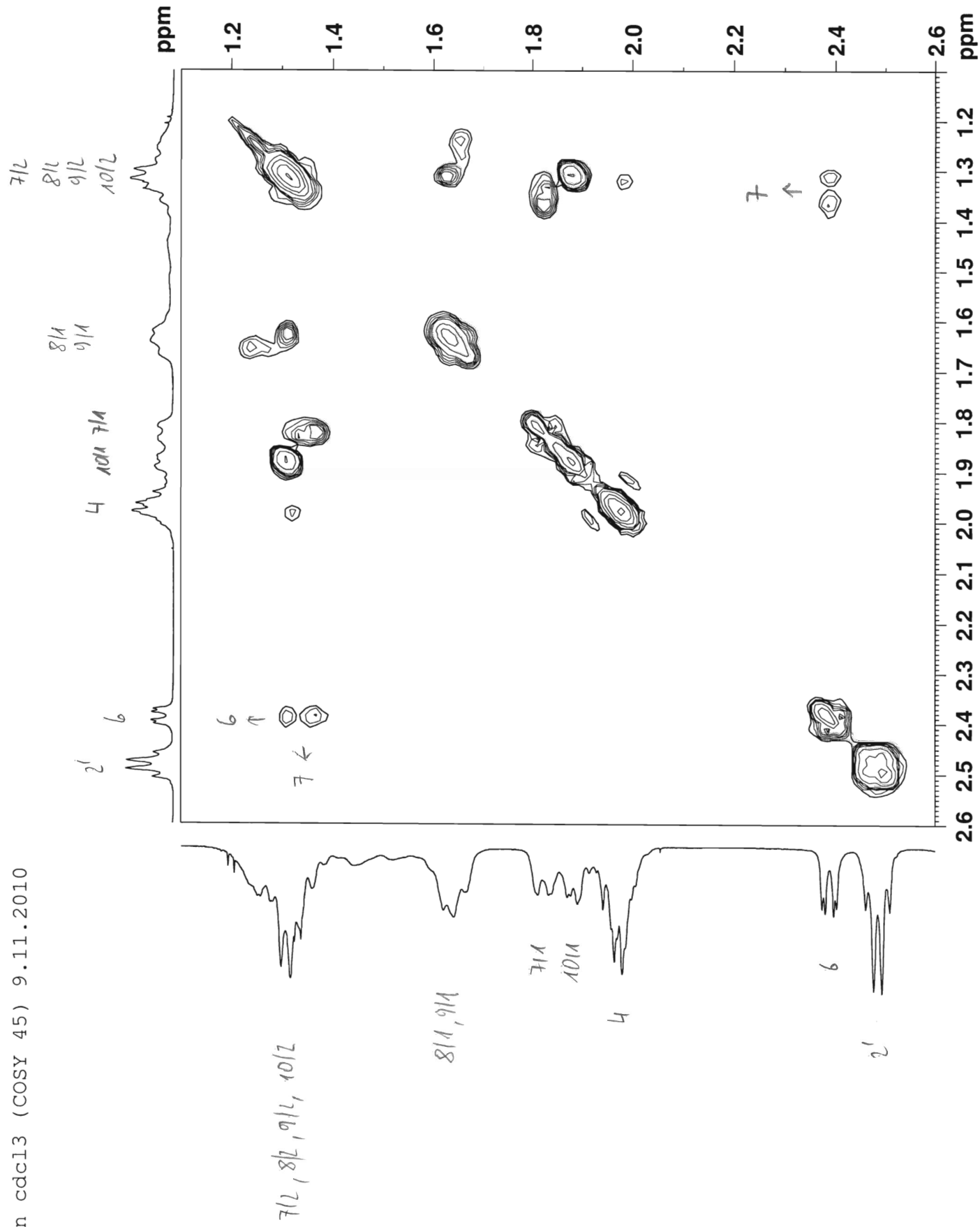




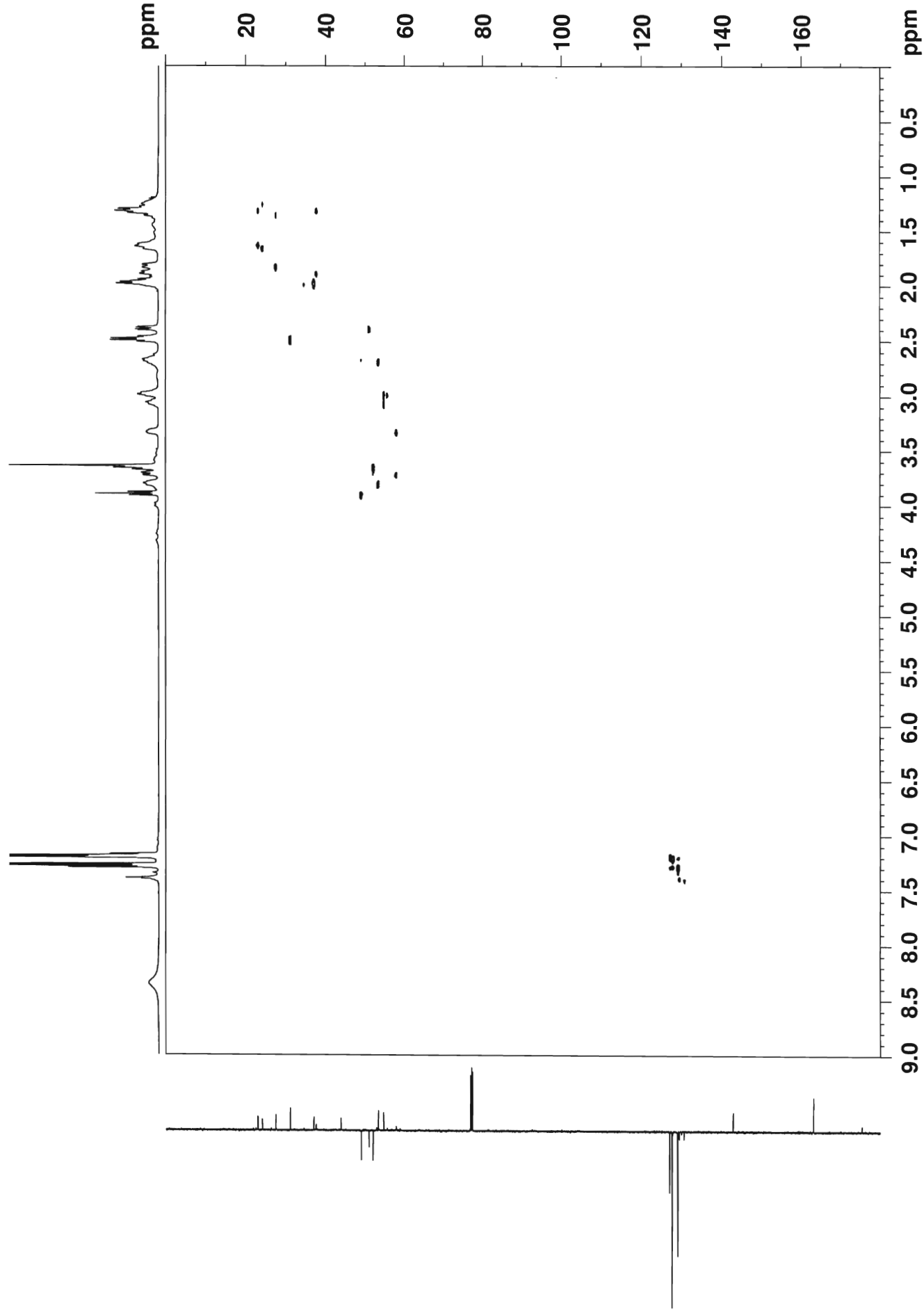
GABA 1c in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010



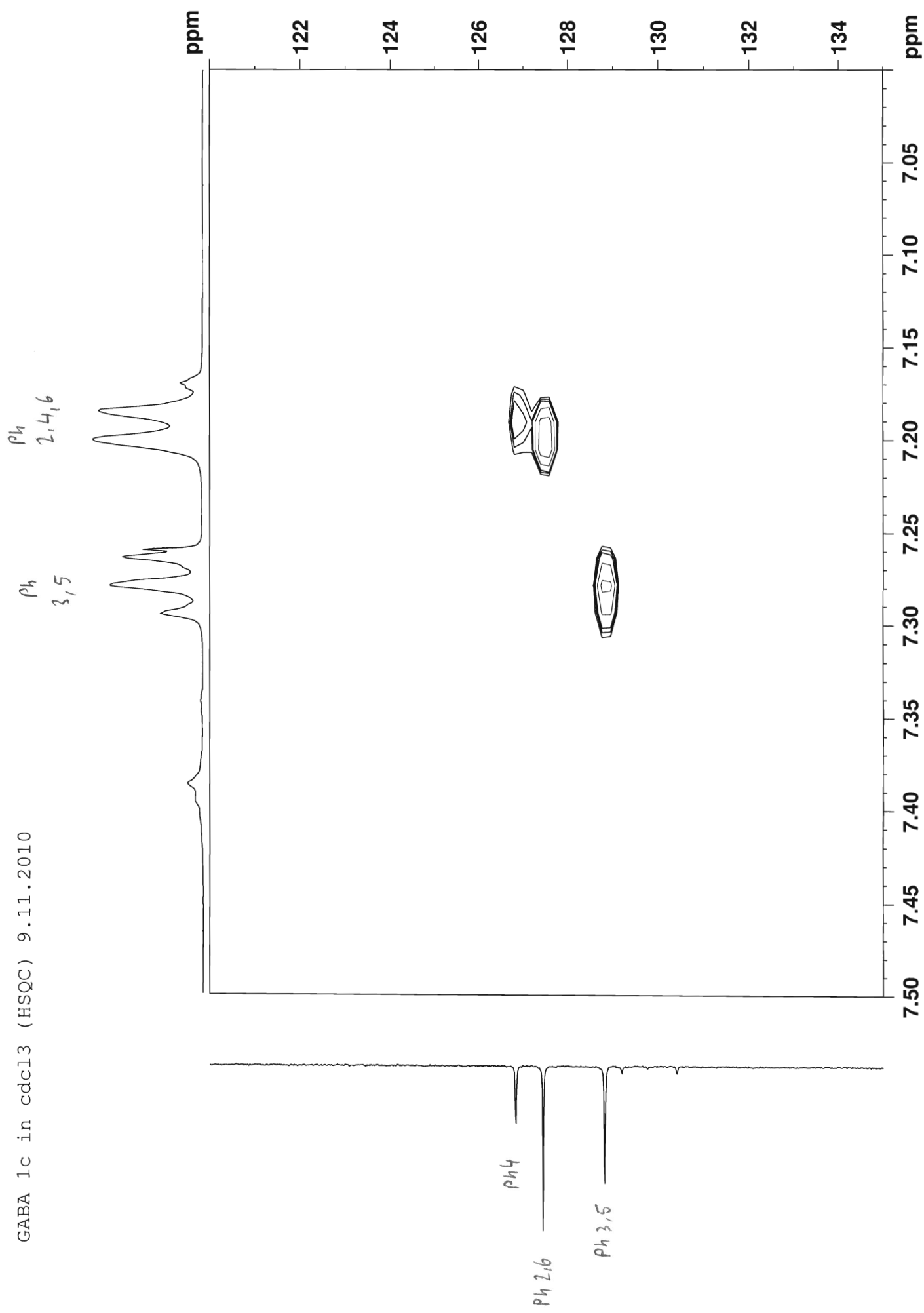


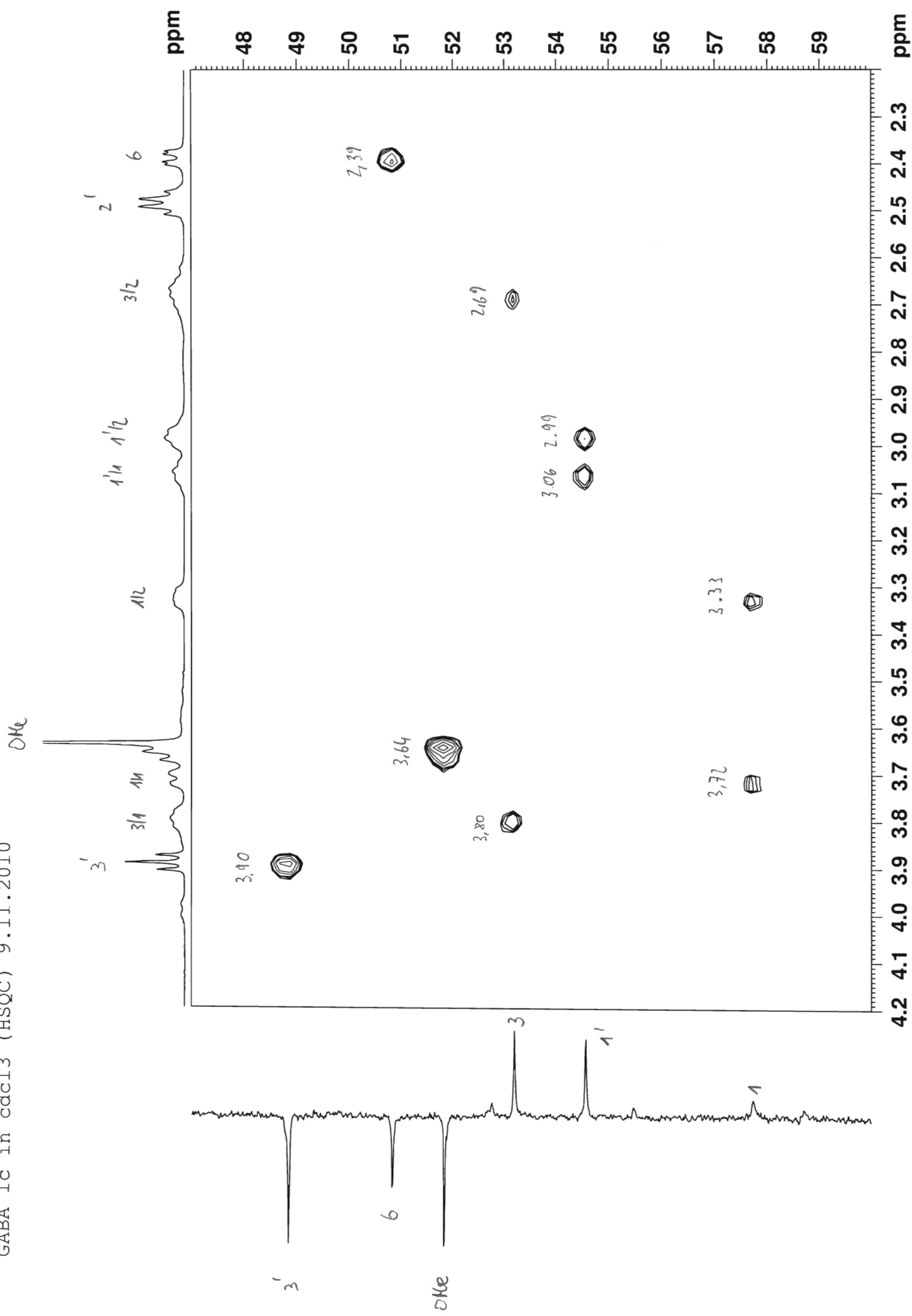


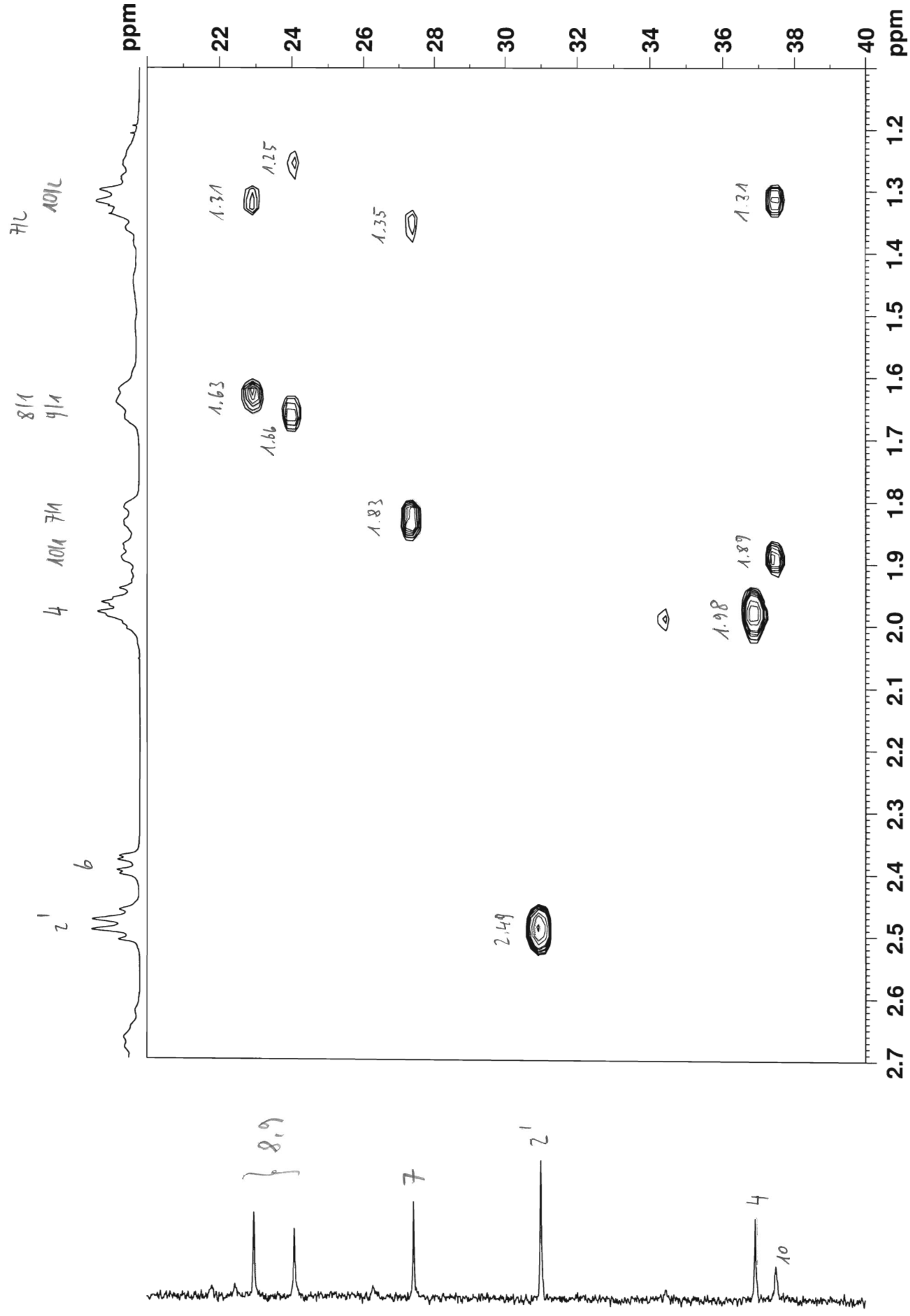
GABA 1c in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010



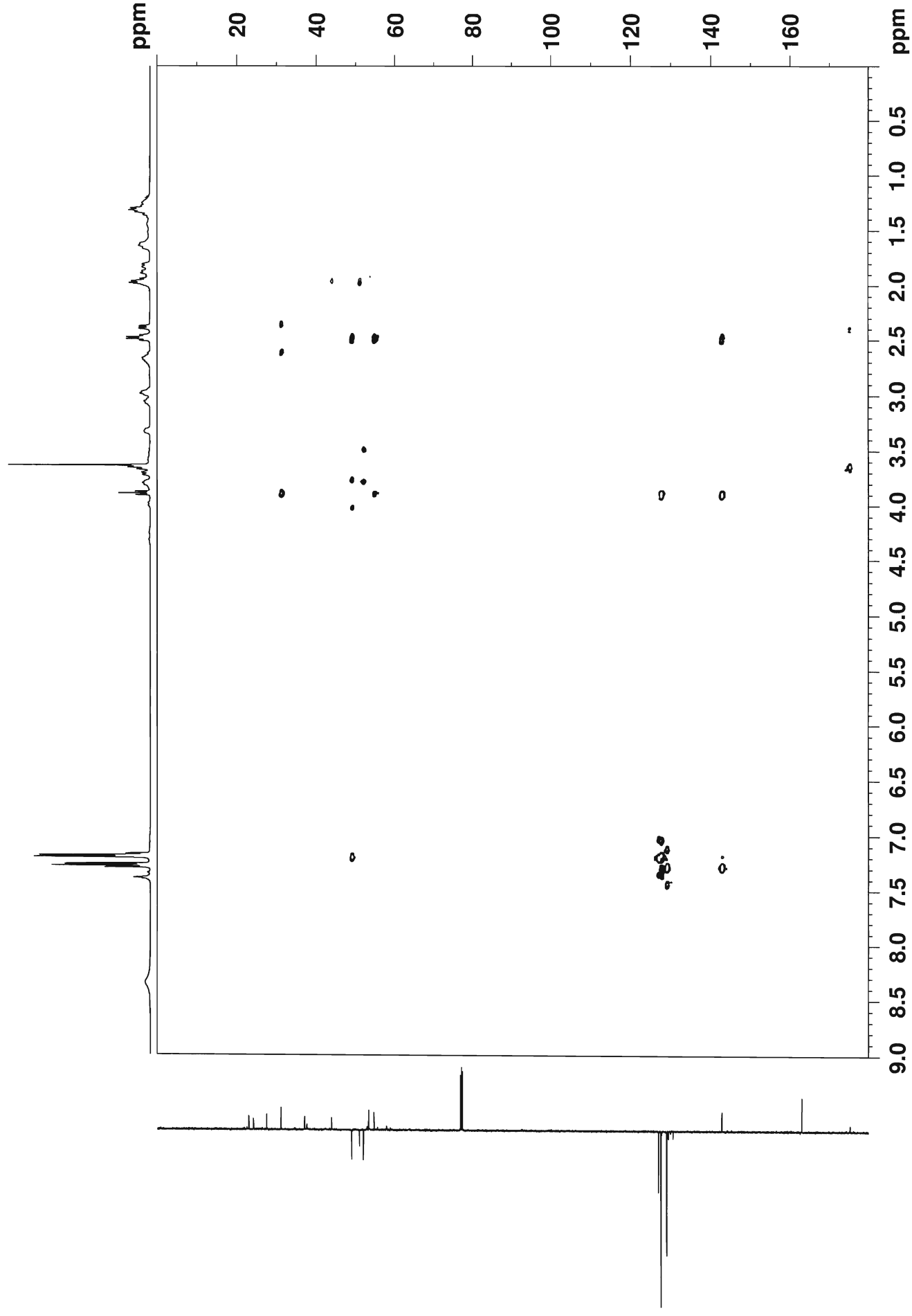
GABA 1c in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010

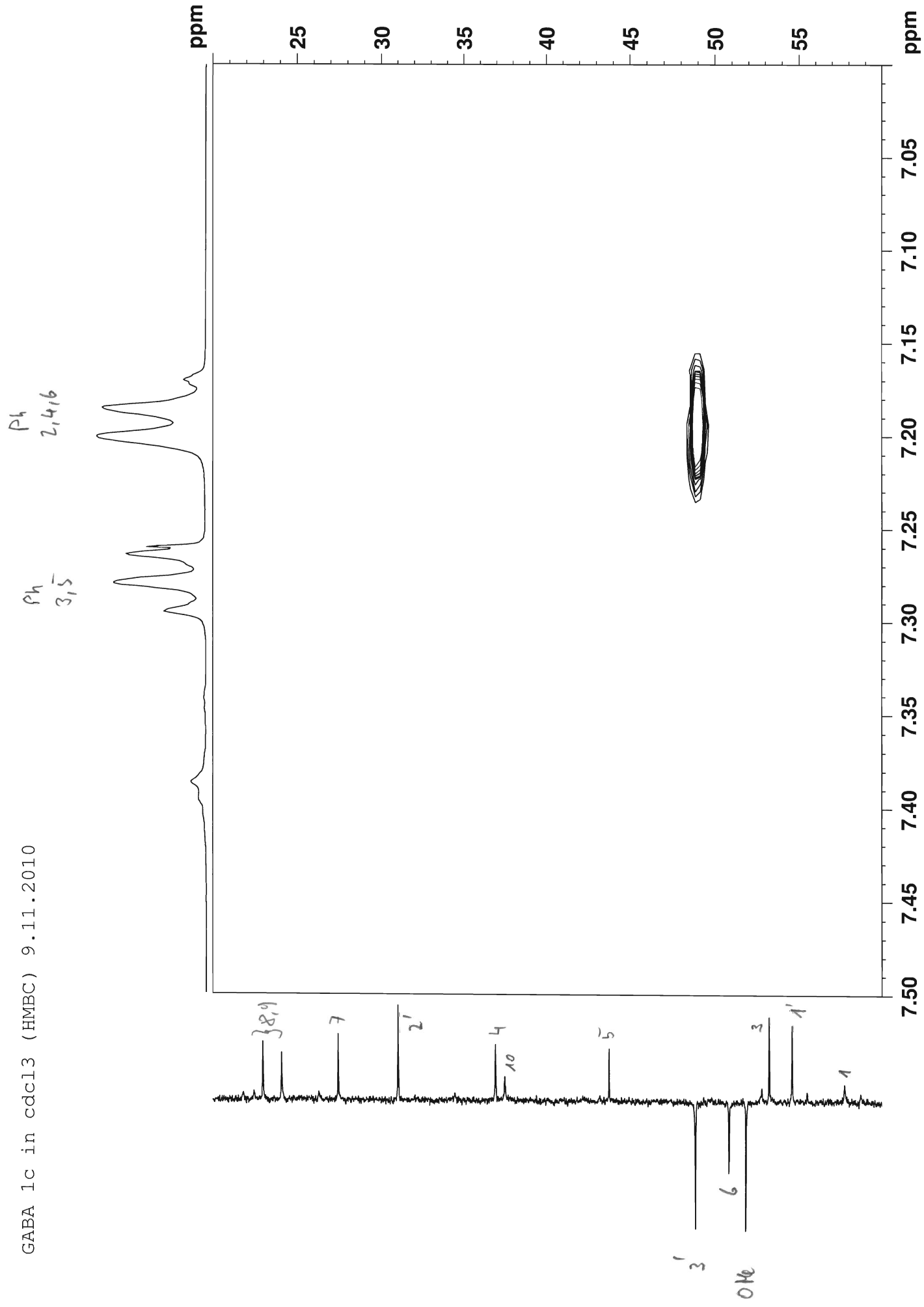


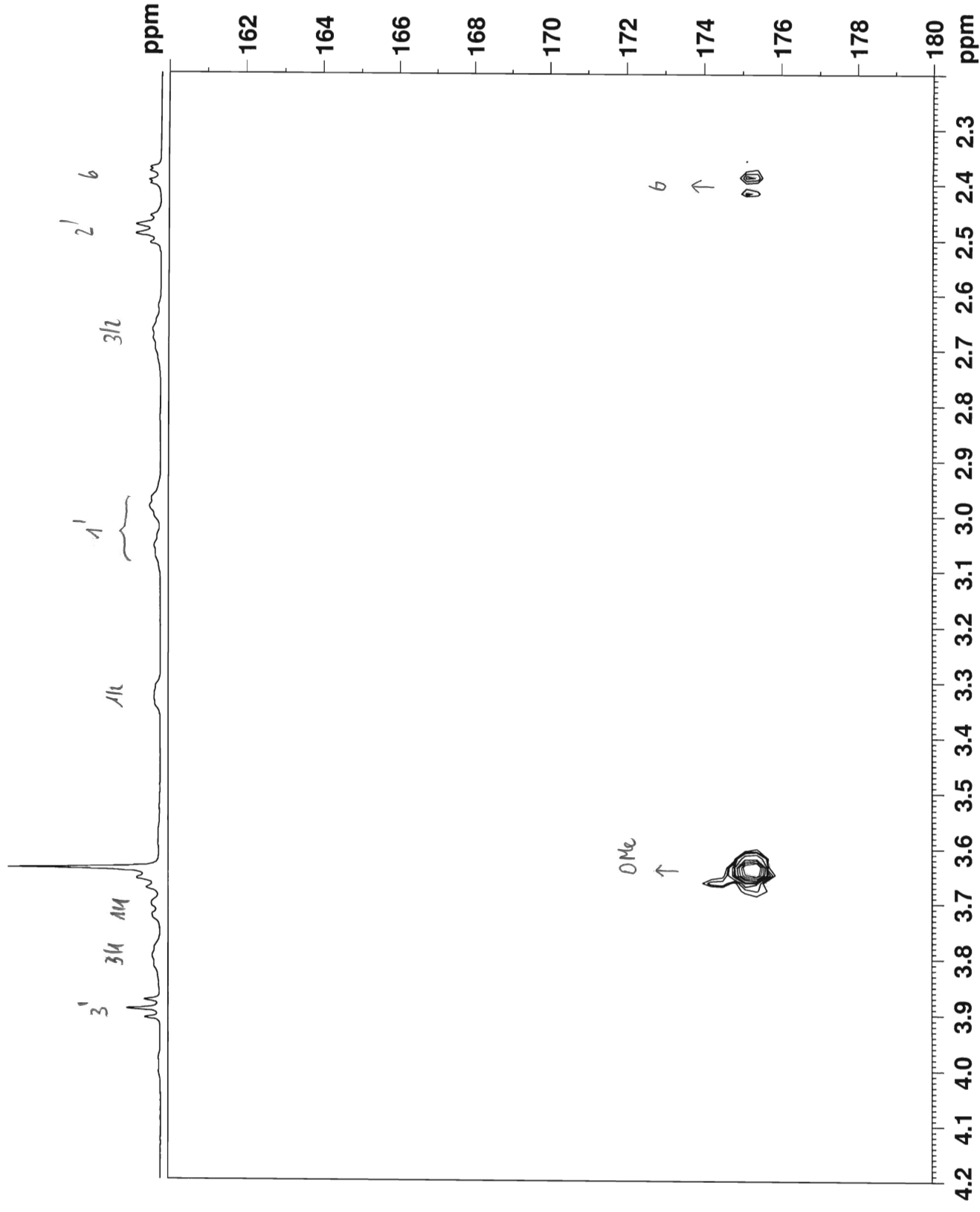




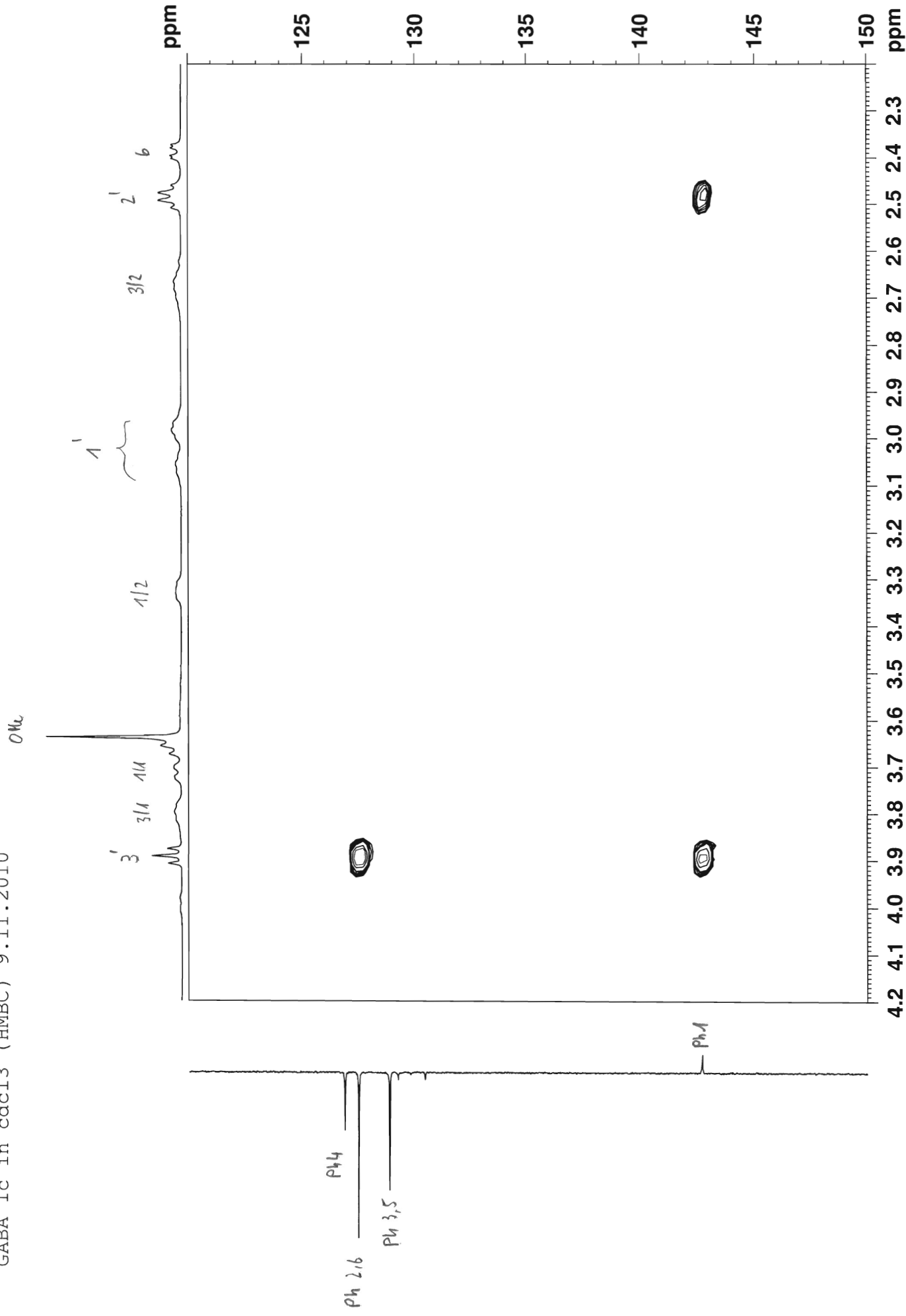
GABA 1c in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



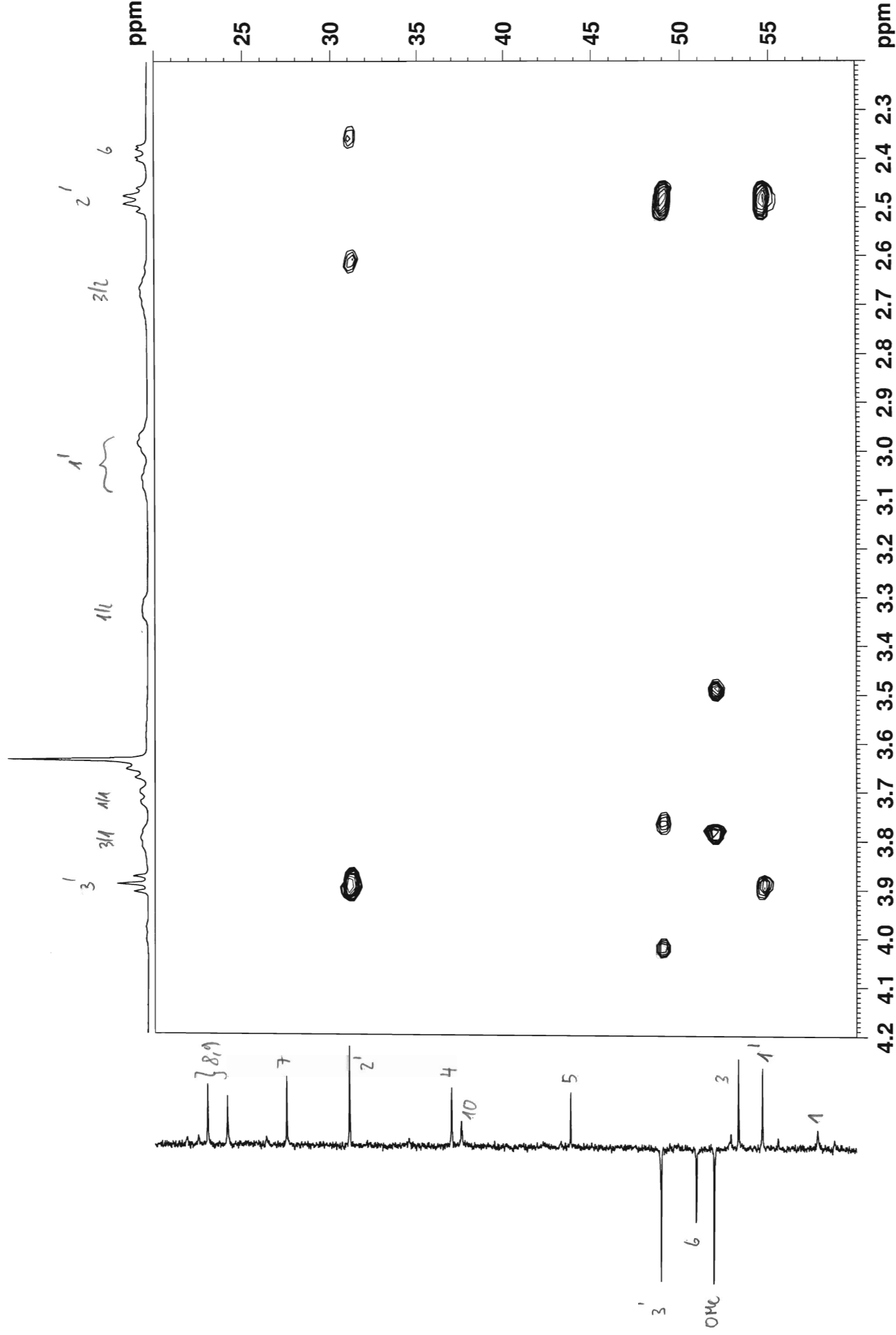


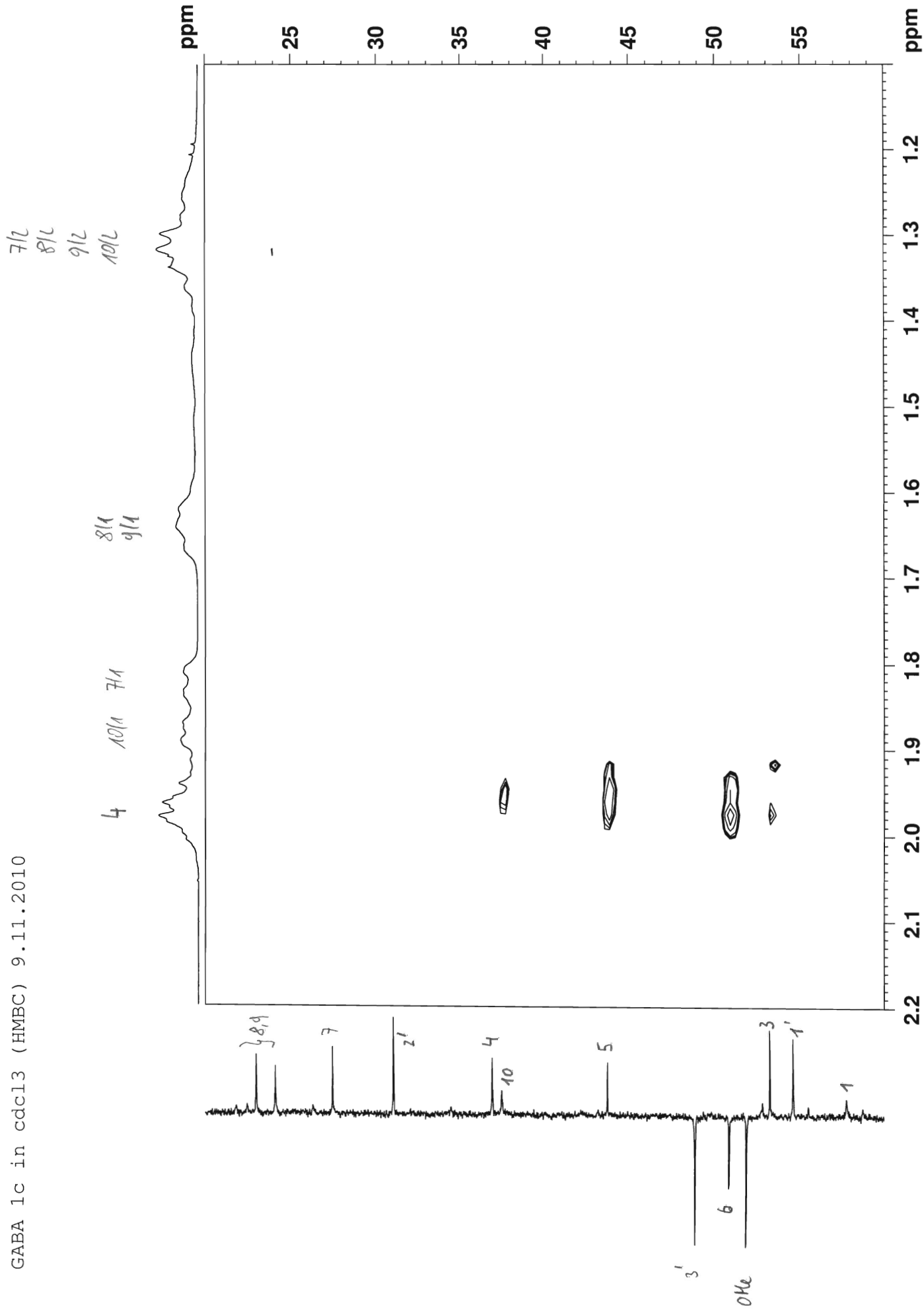


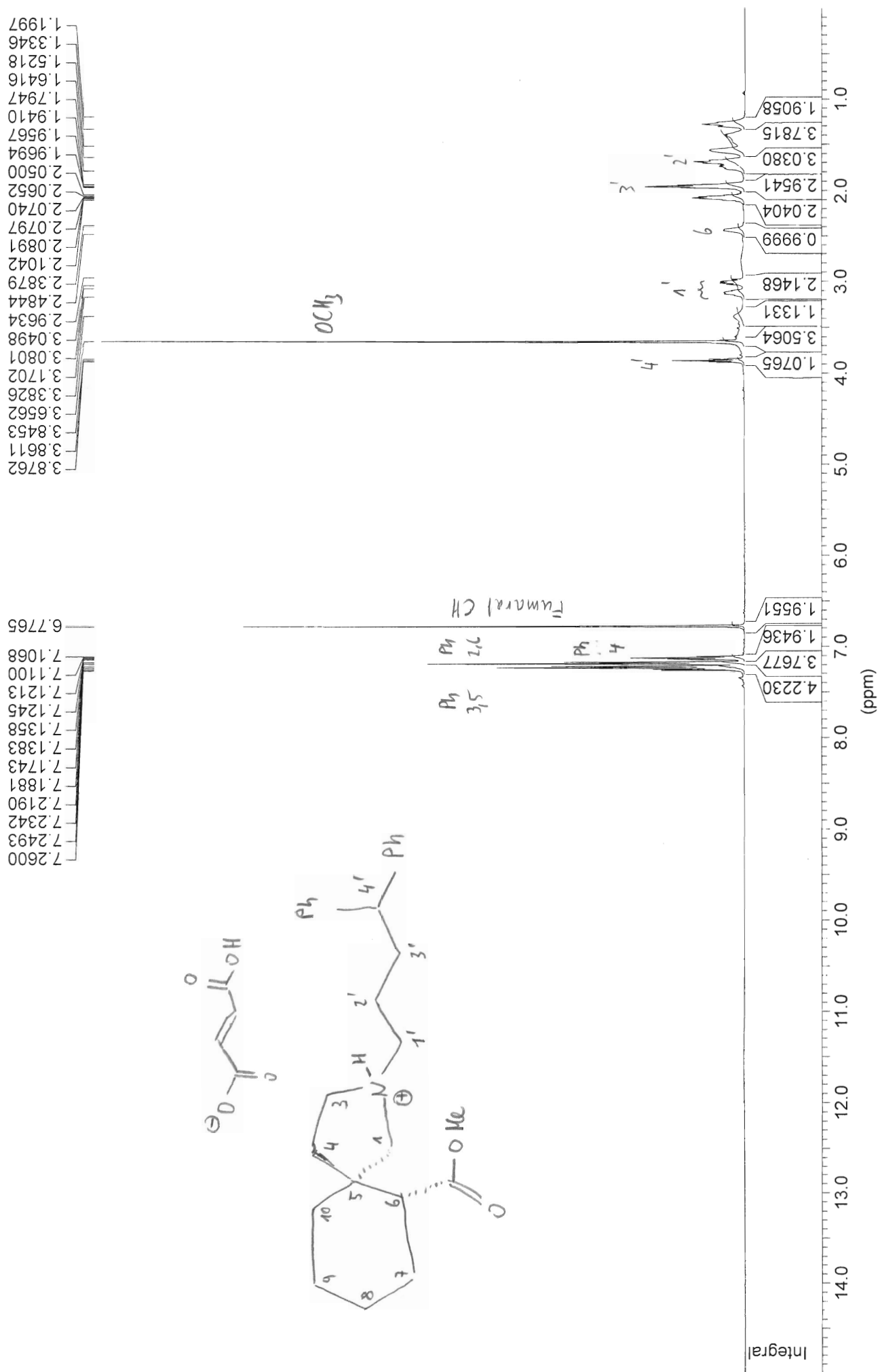
GABA 1c in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

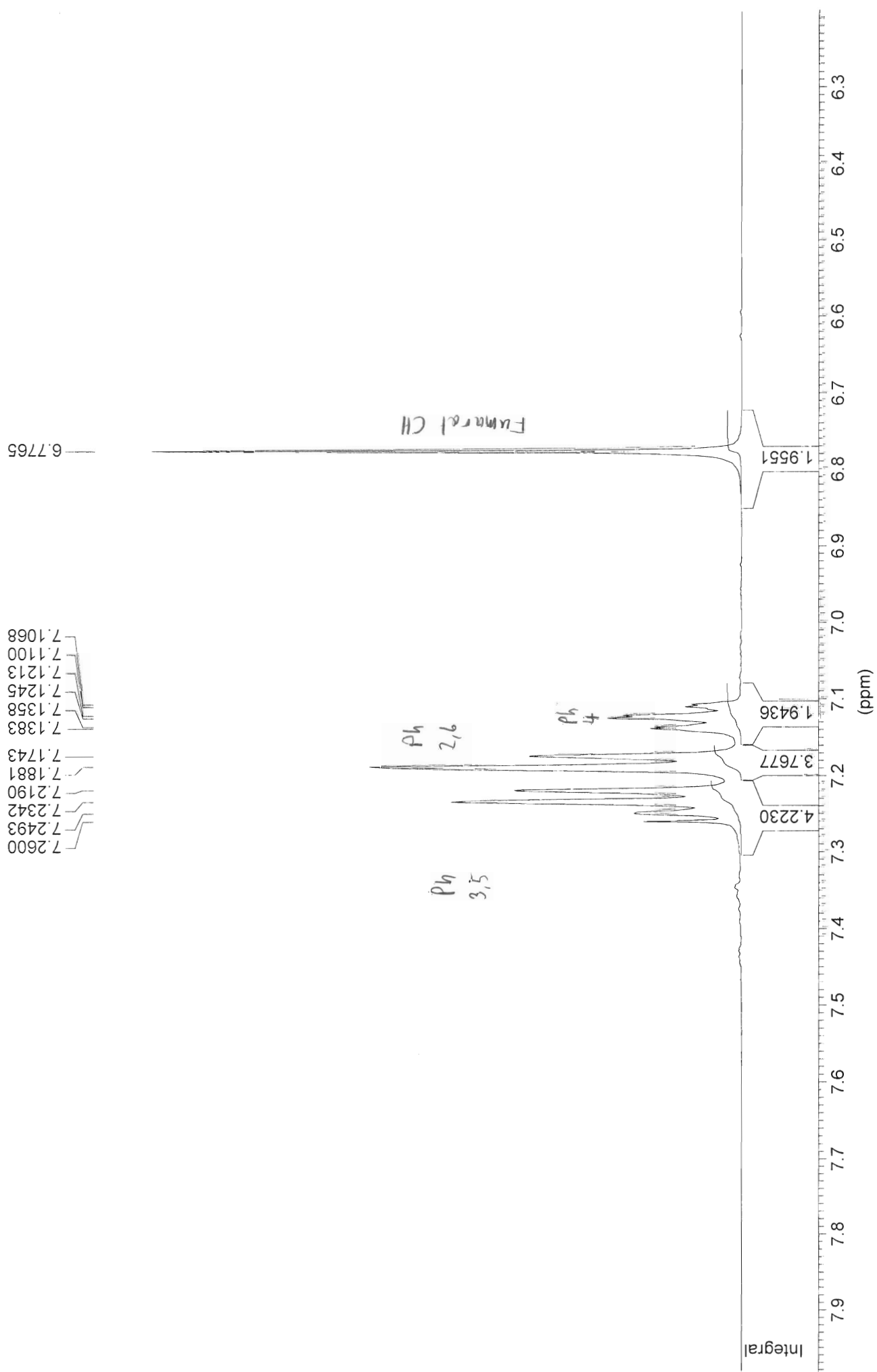


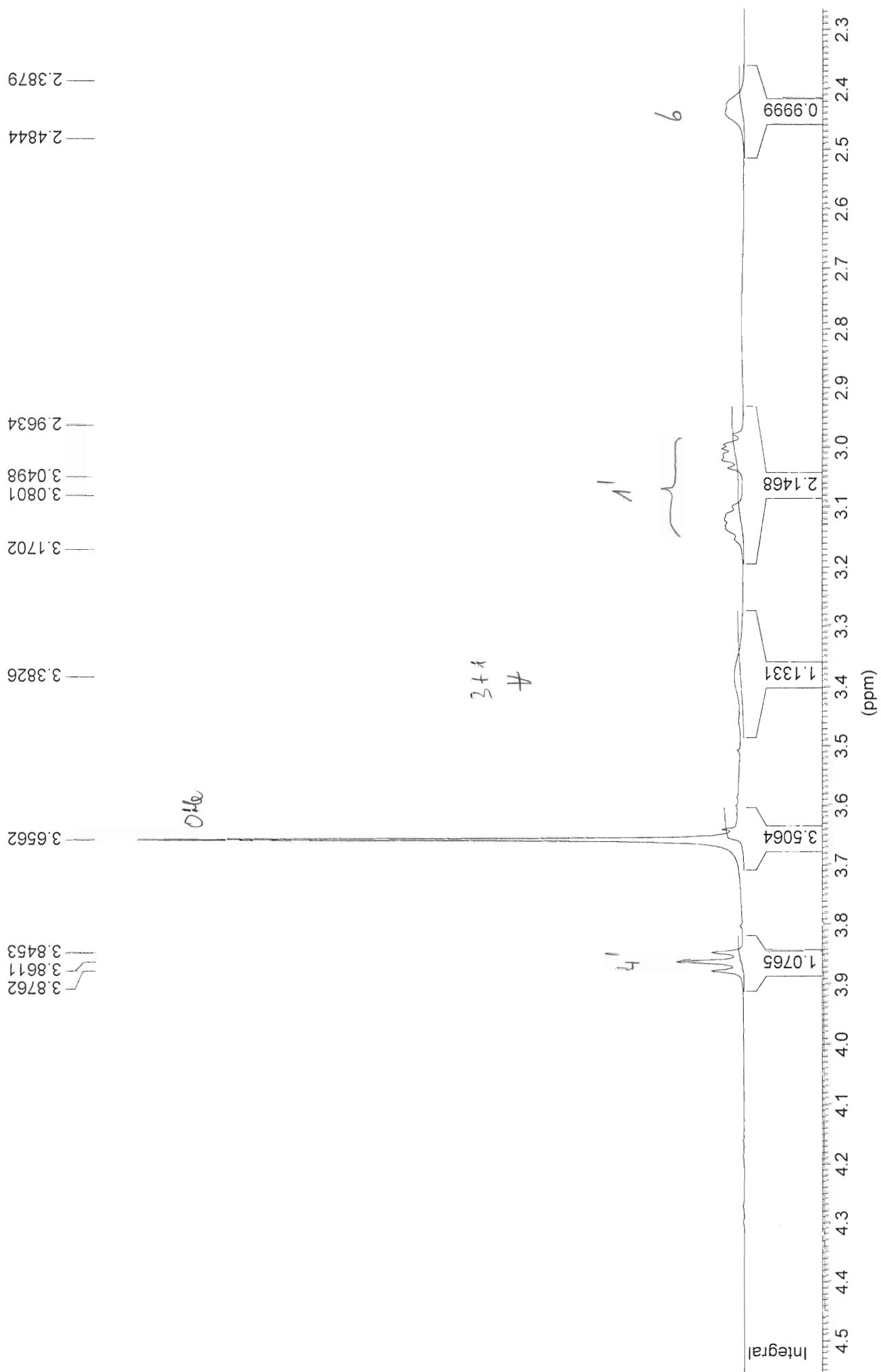
OMe

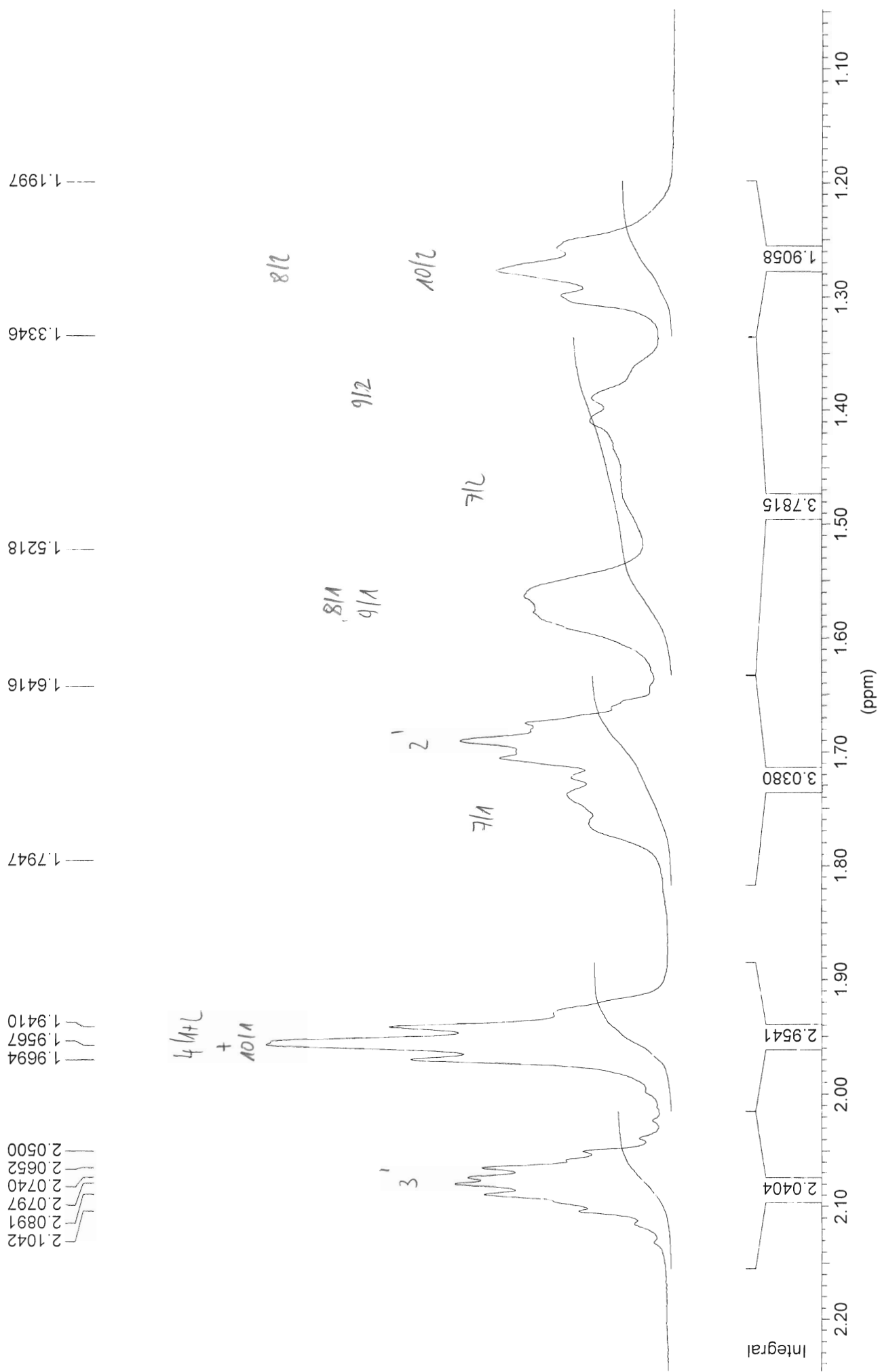


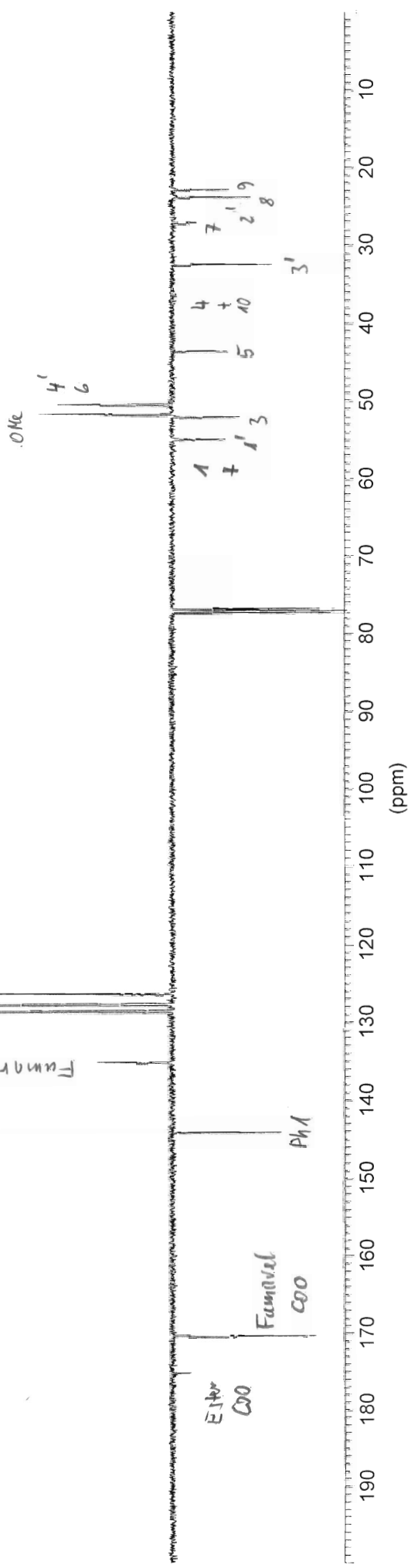
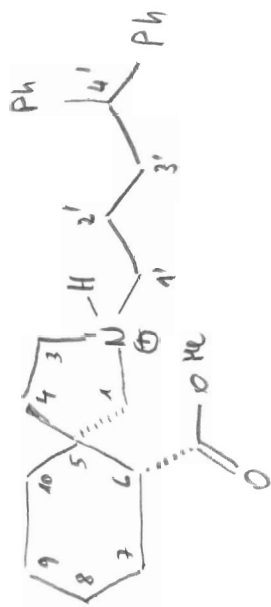
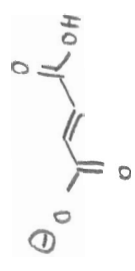


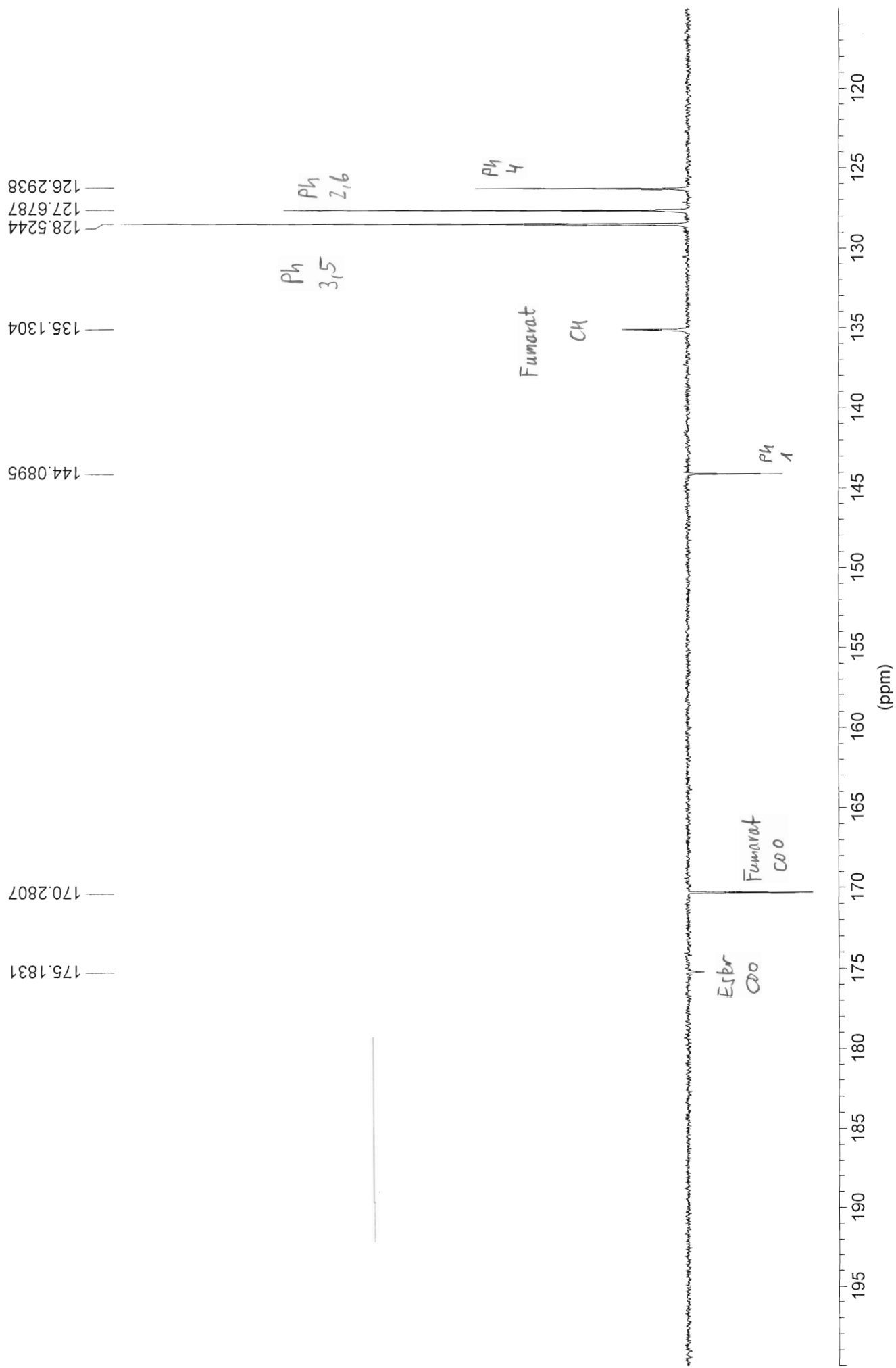


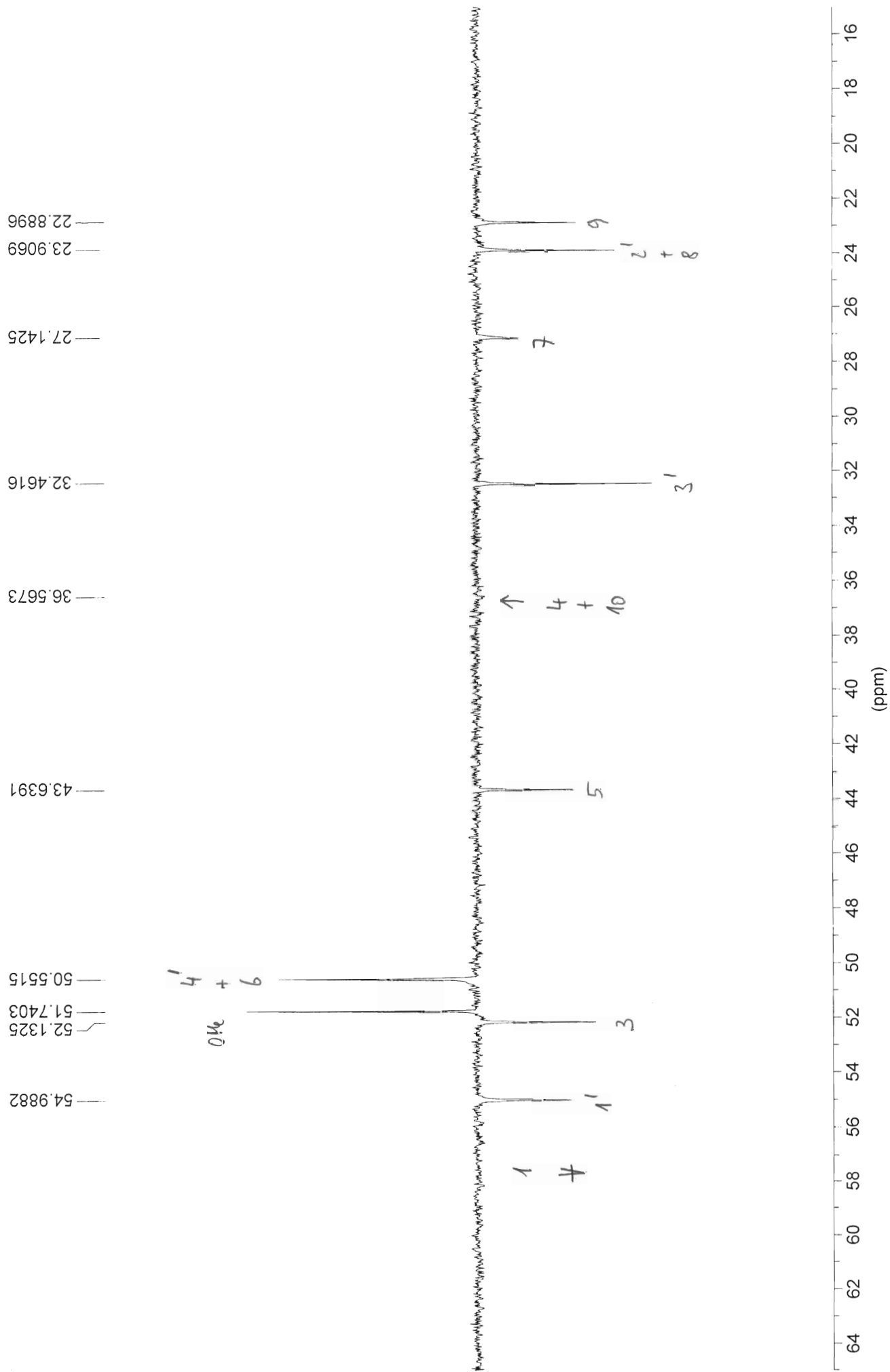




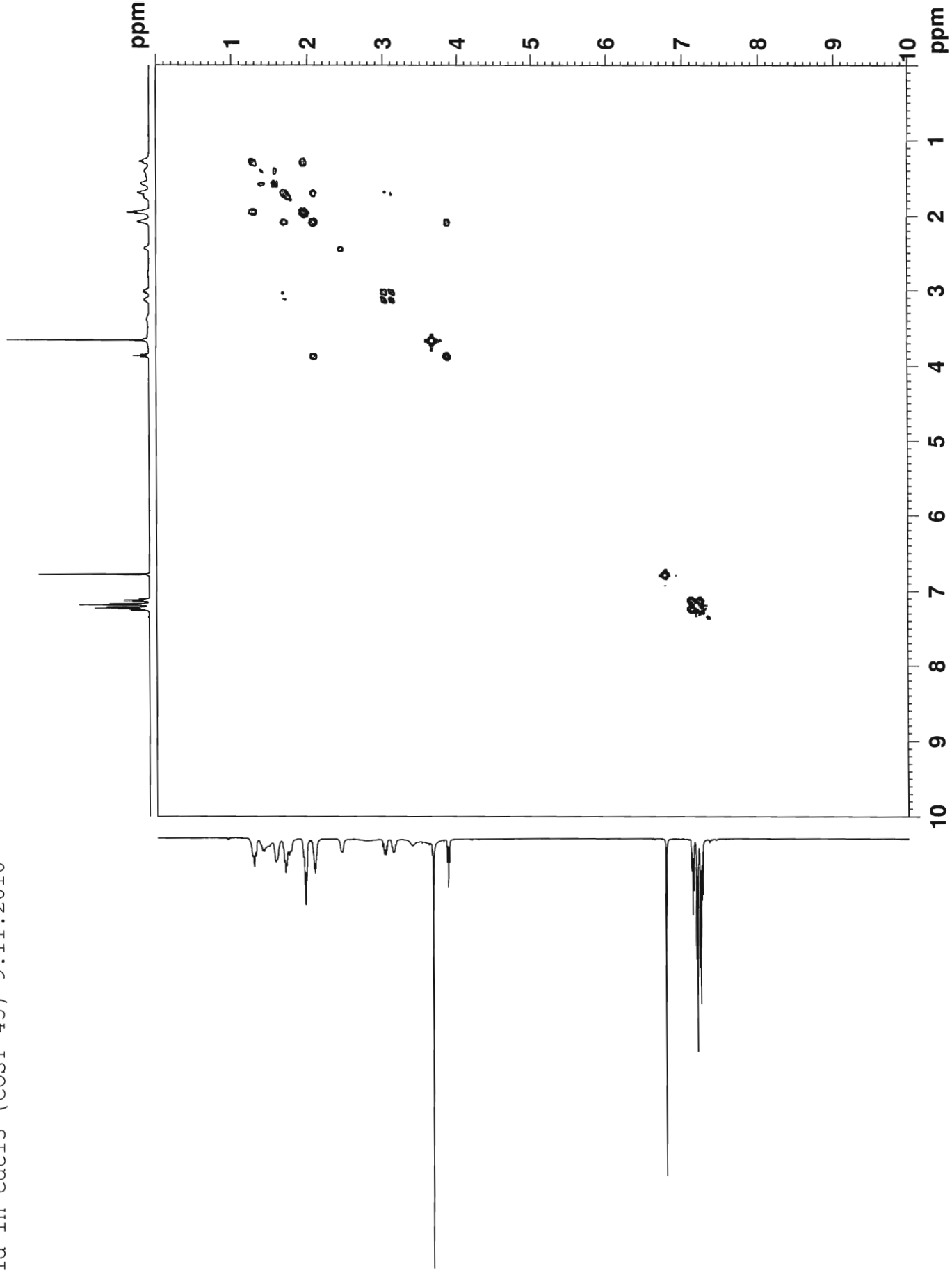


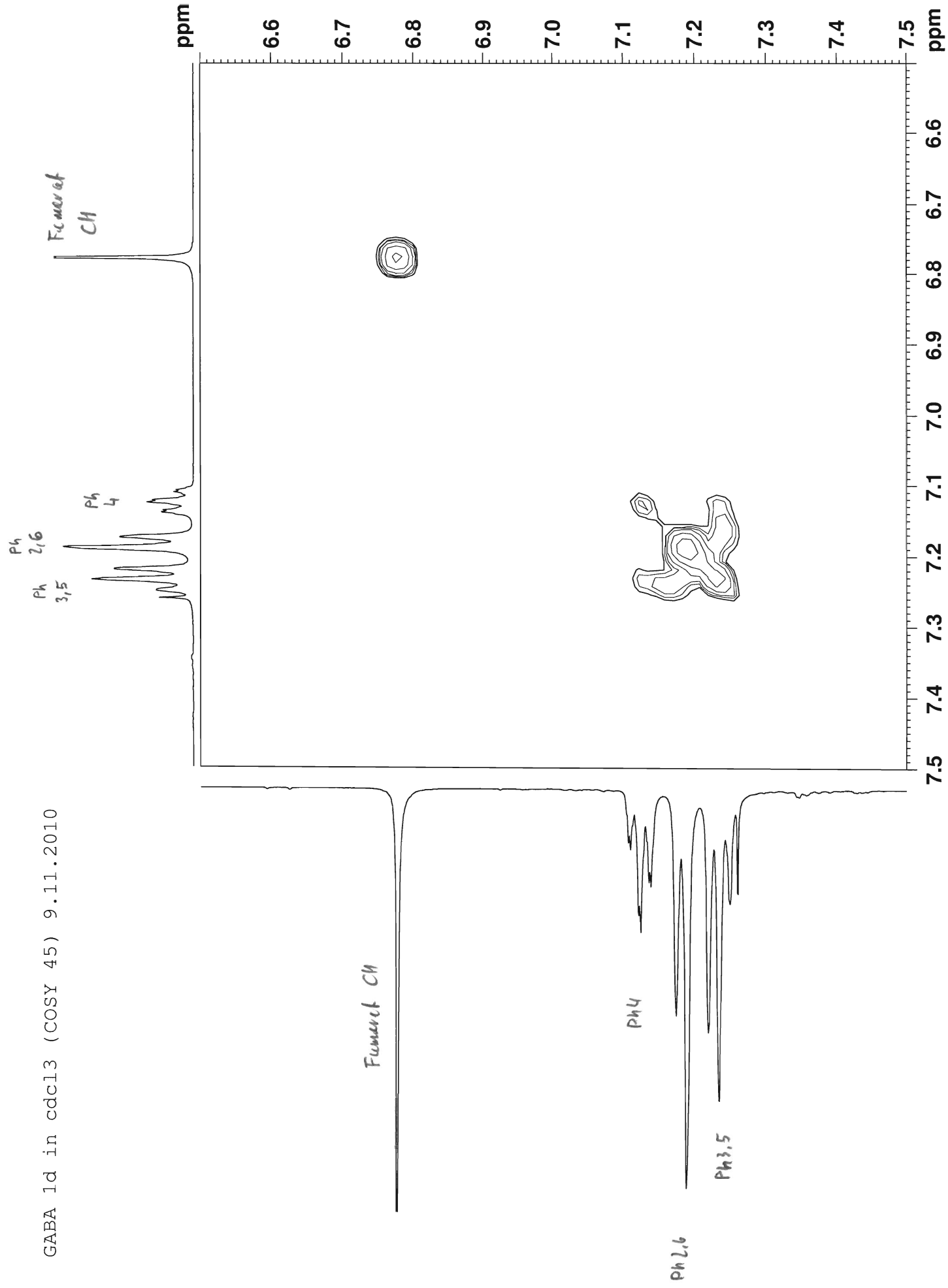


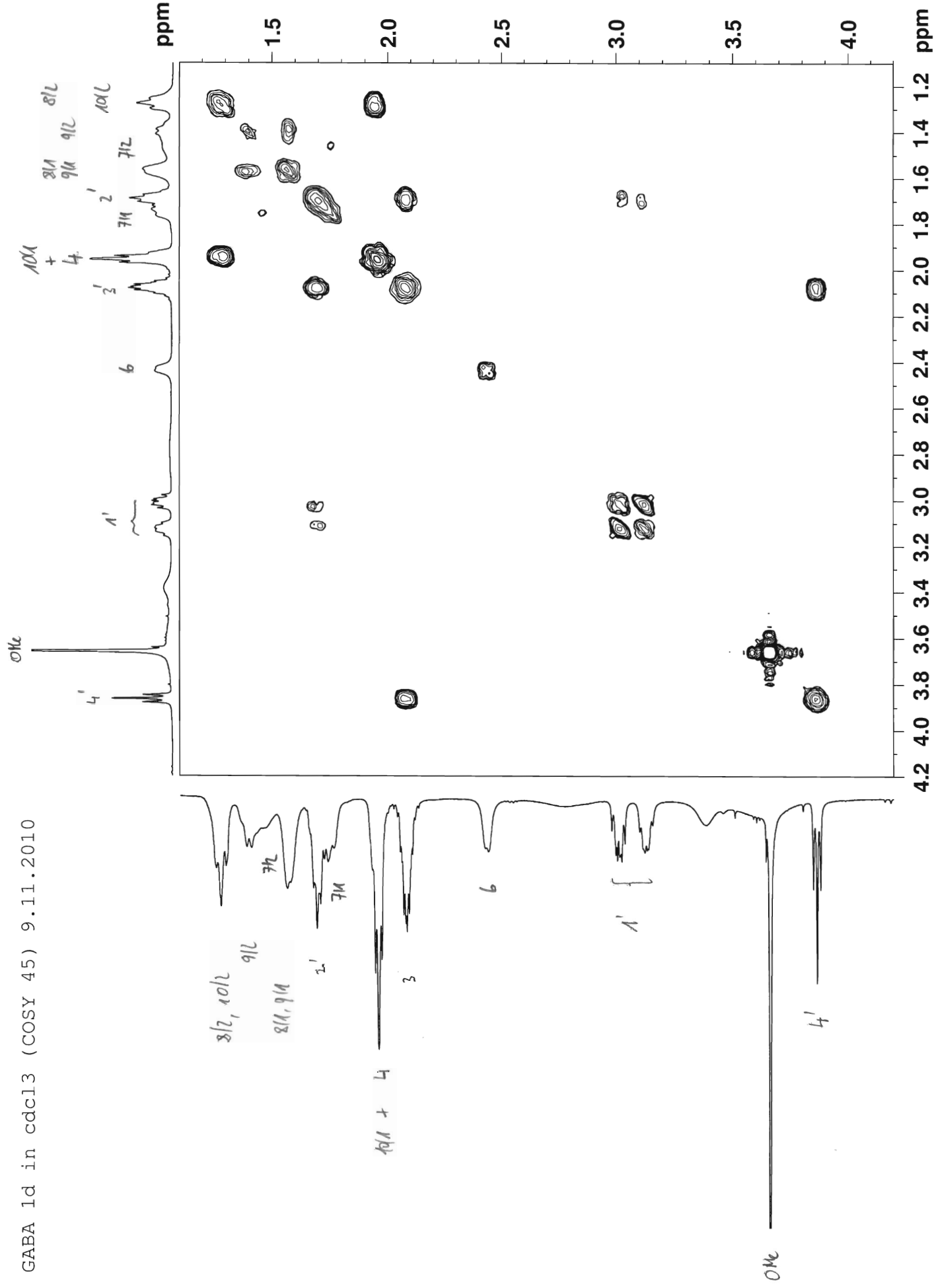


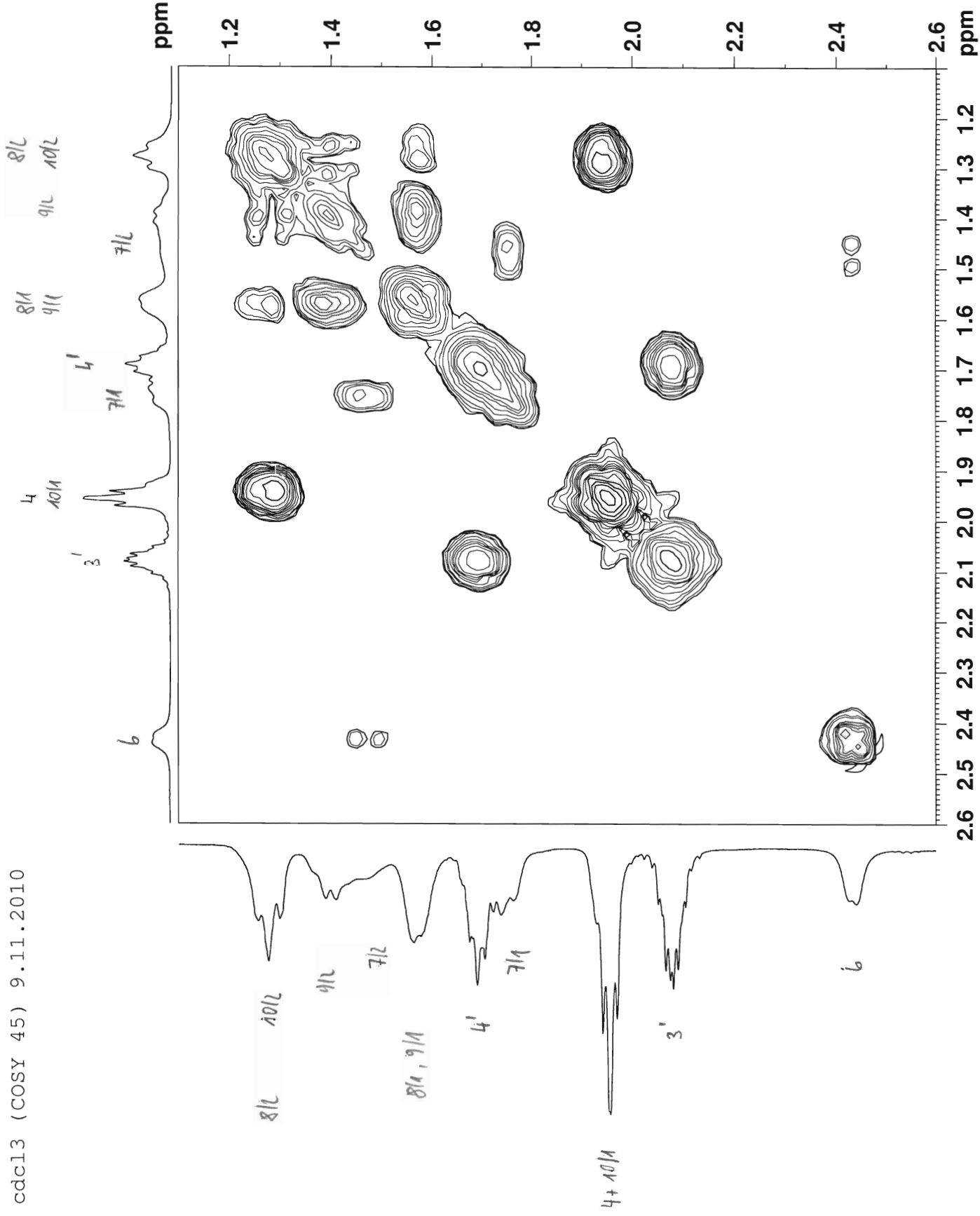


GABA 1d in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010

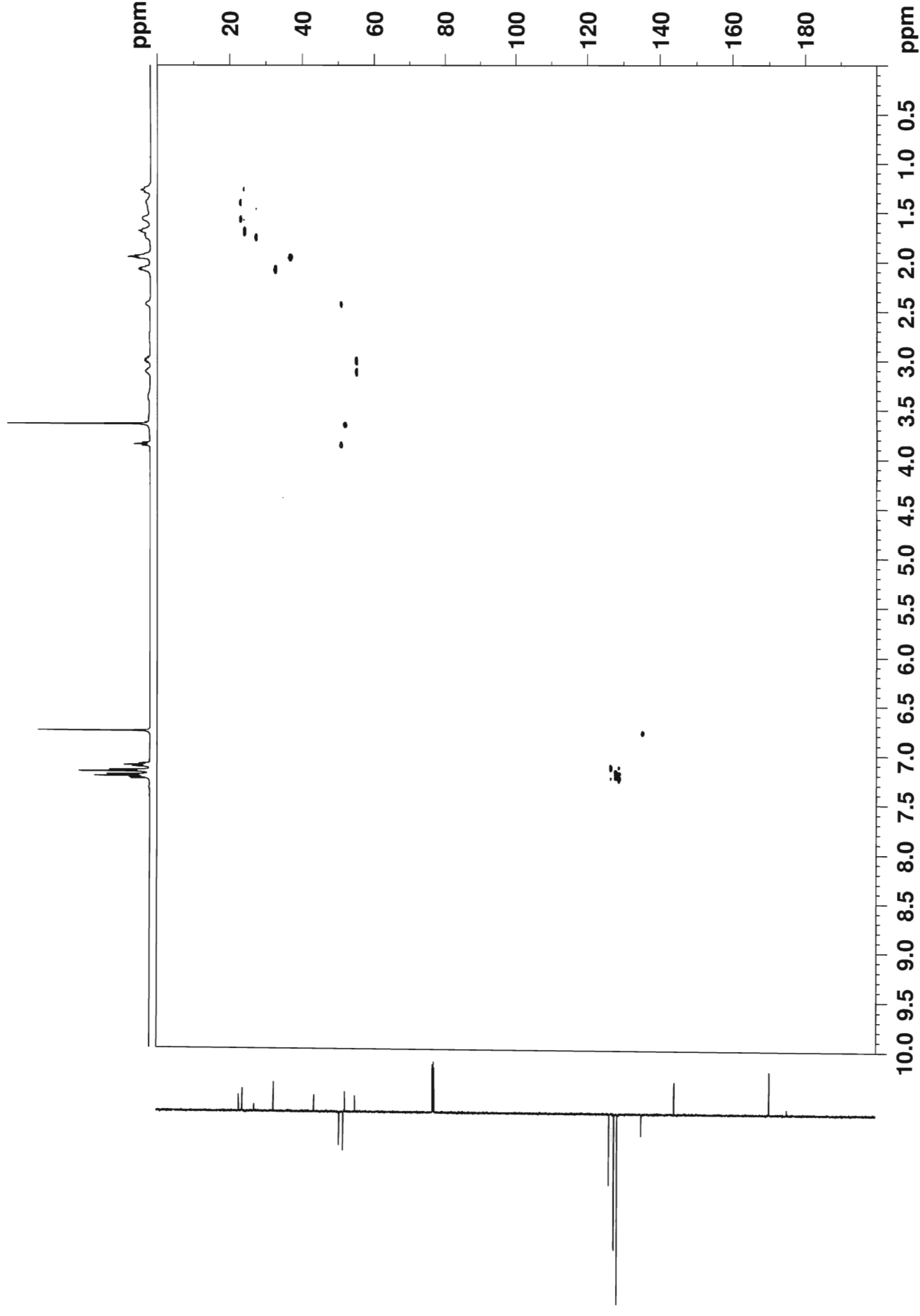


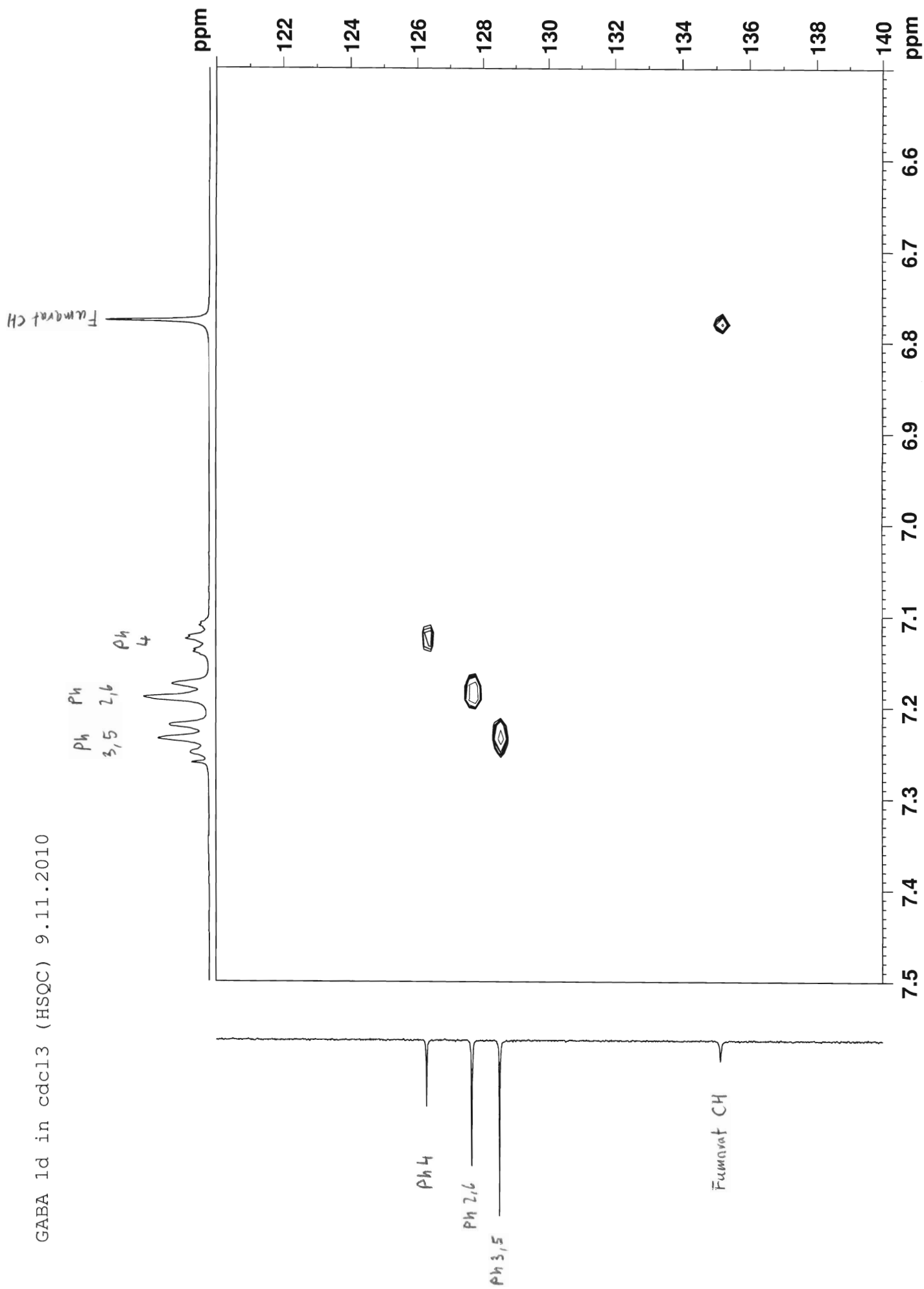


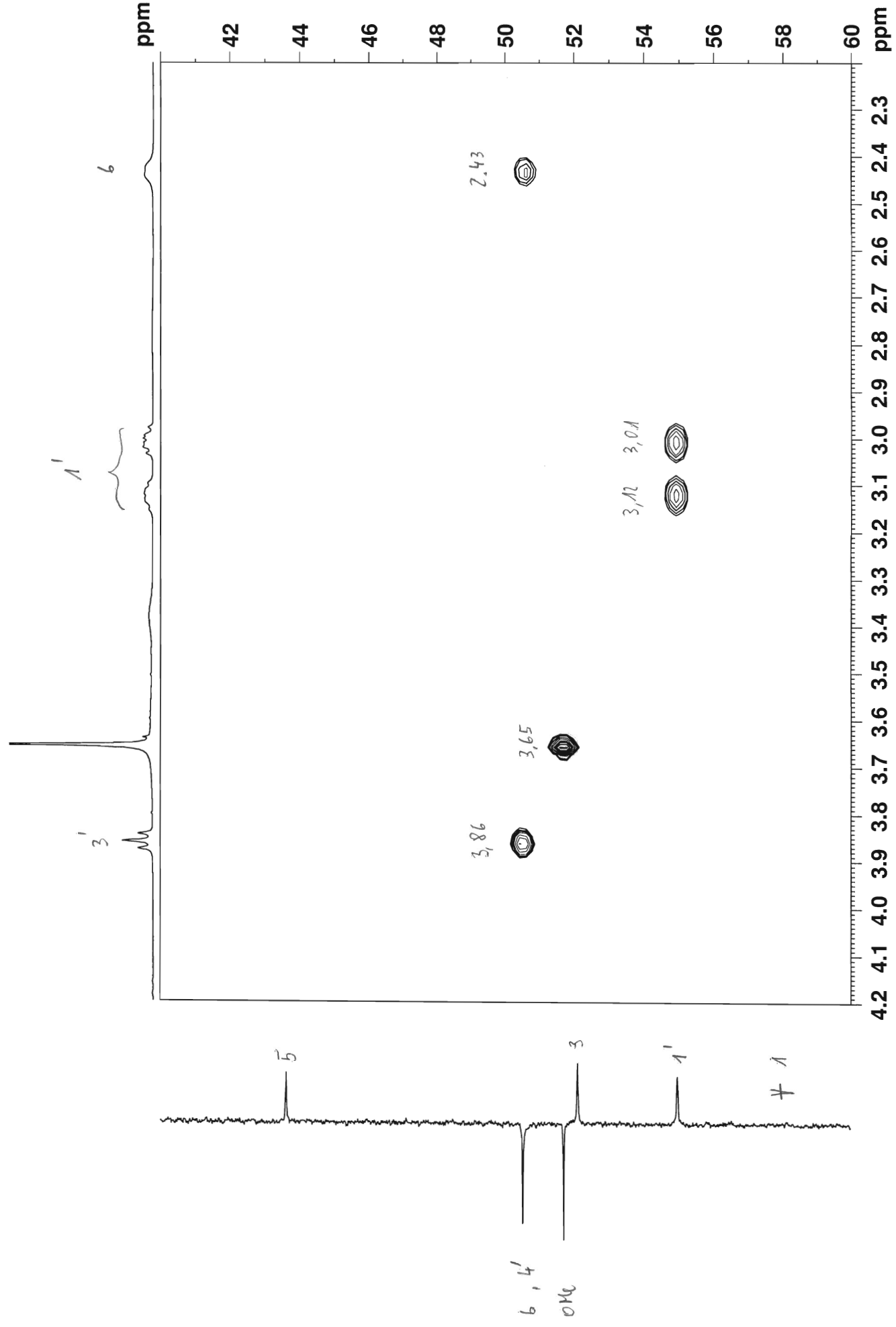


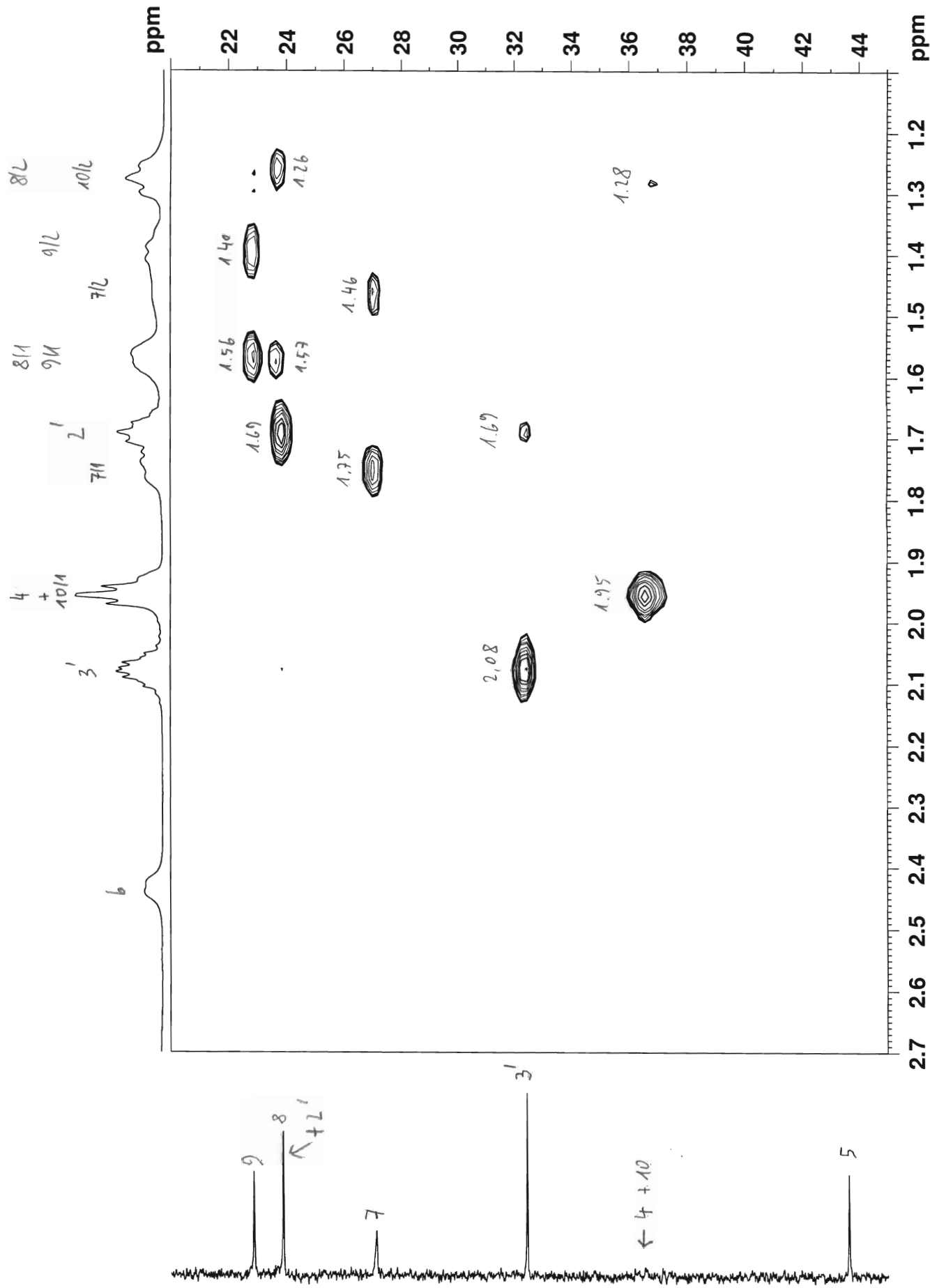


GABA 1d in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010

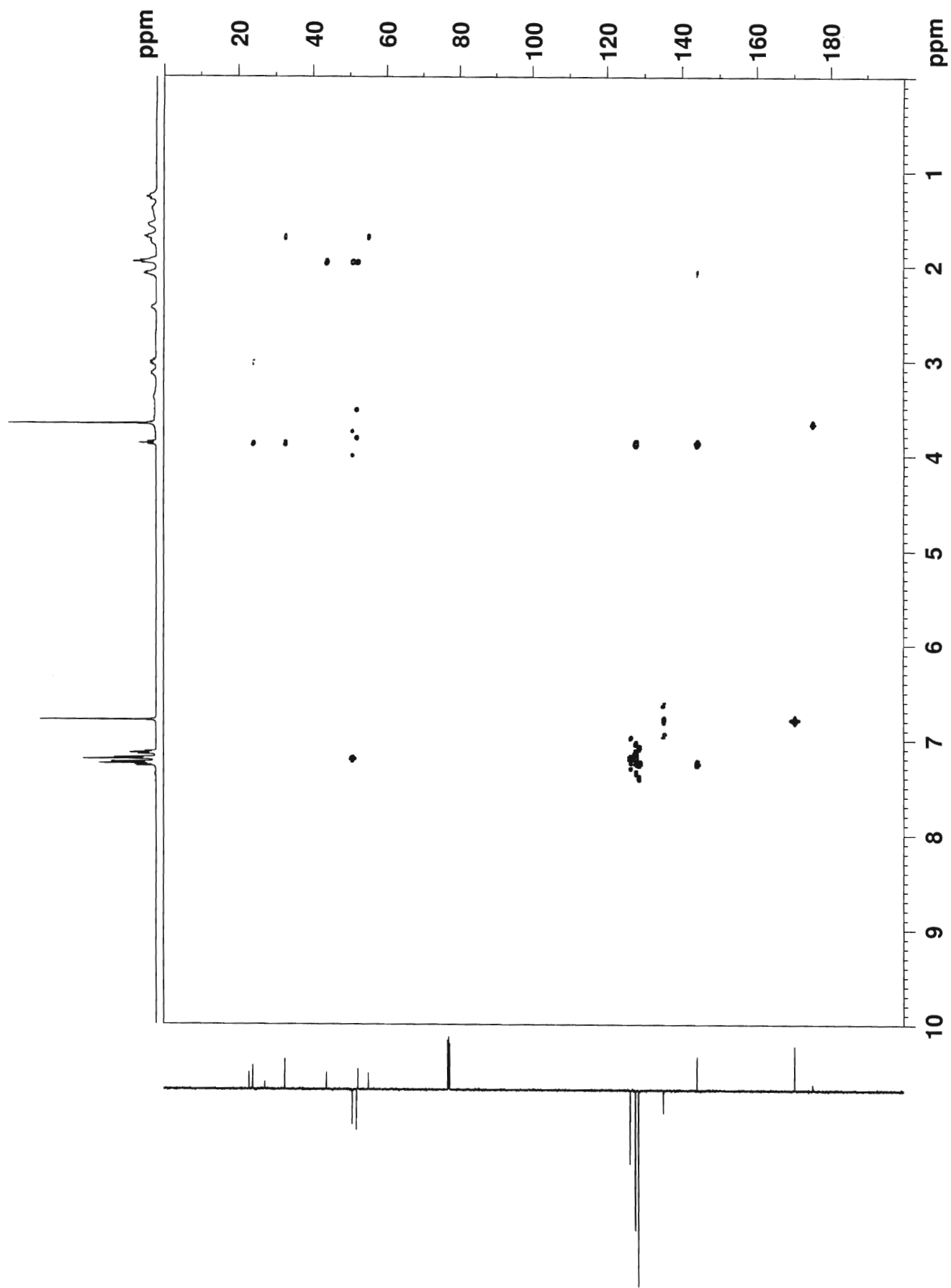


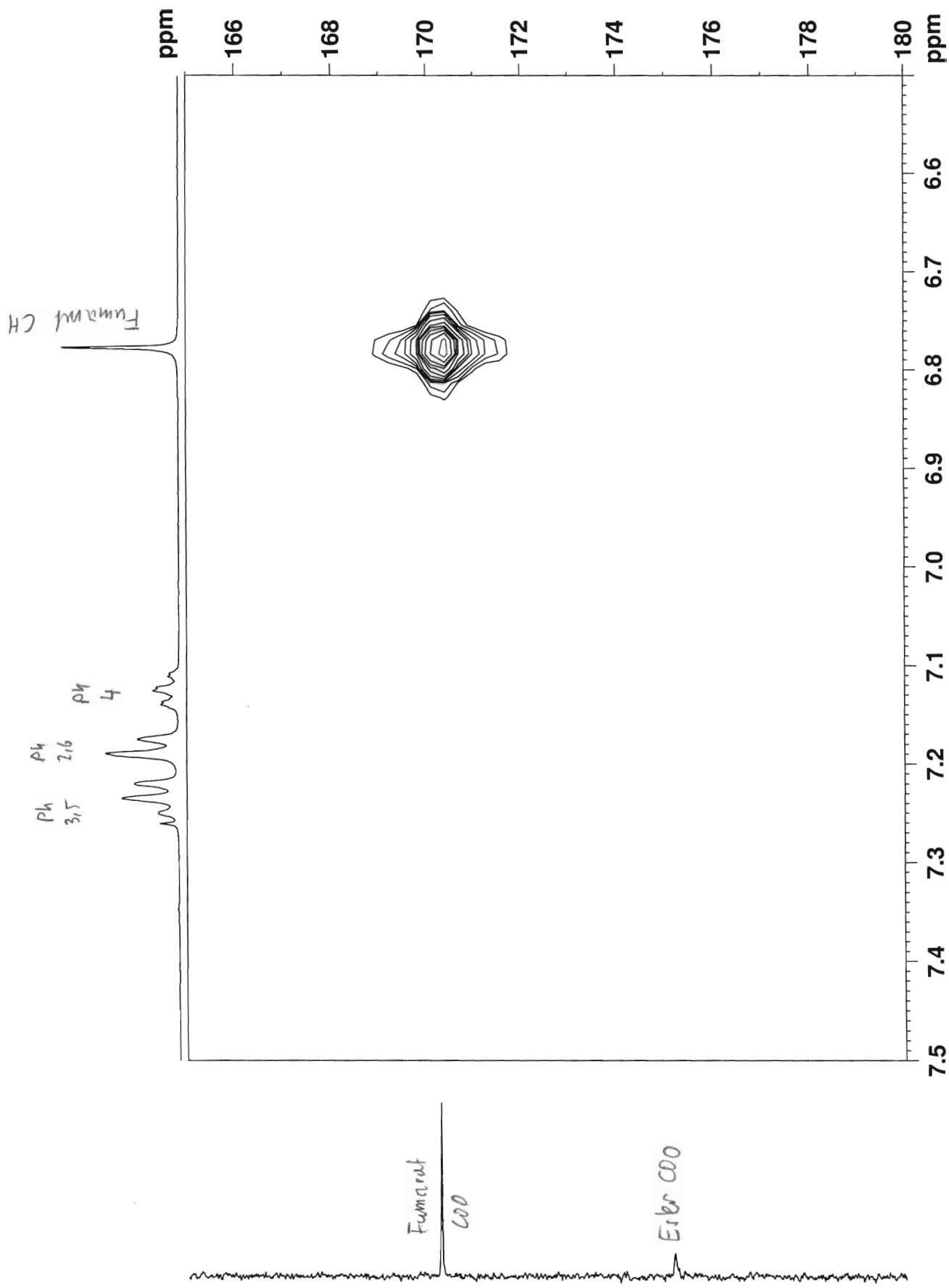




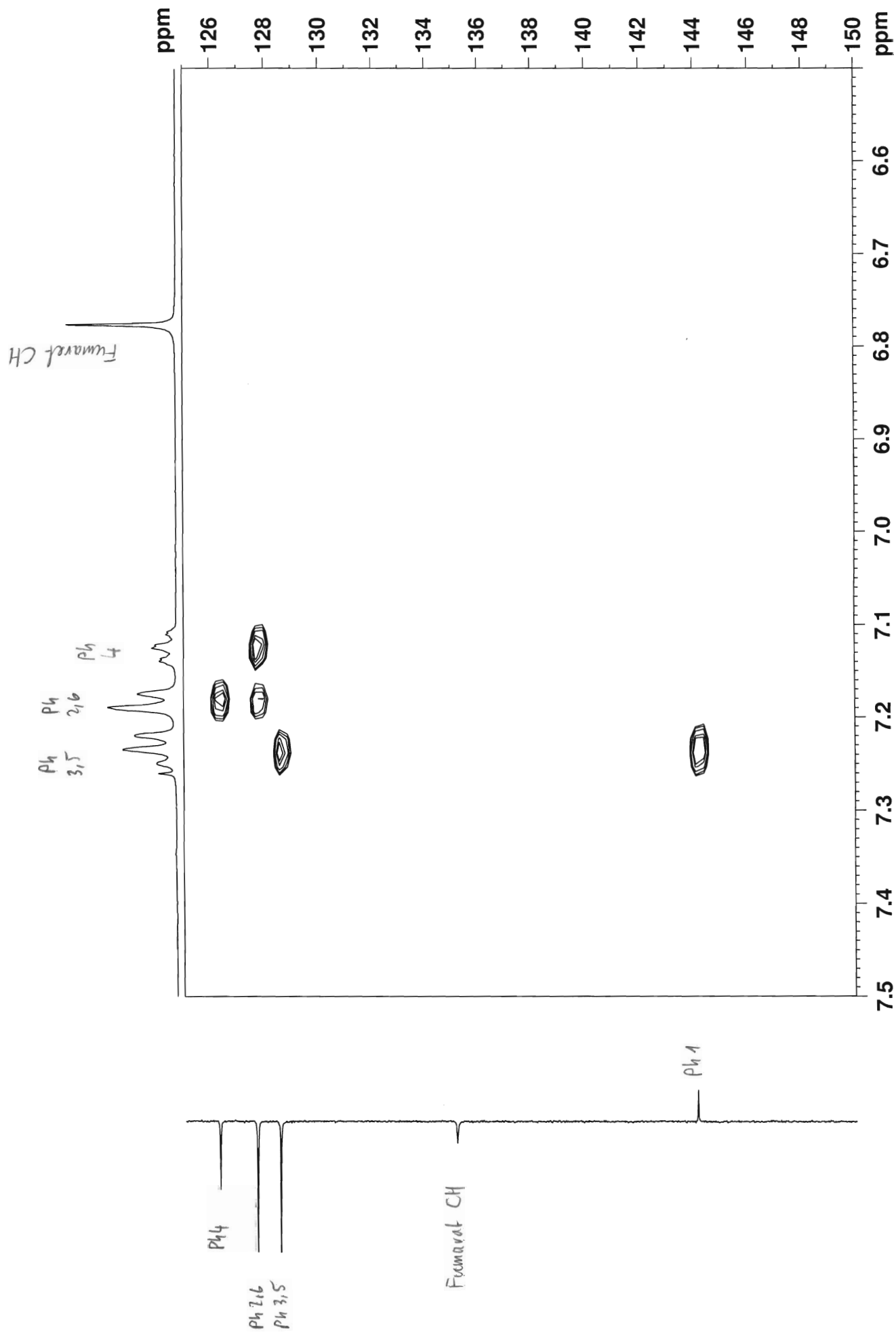


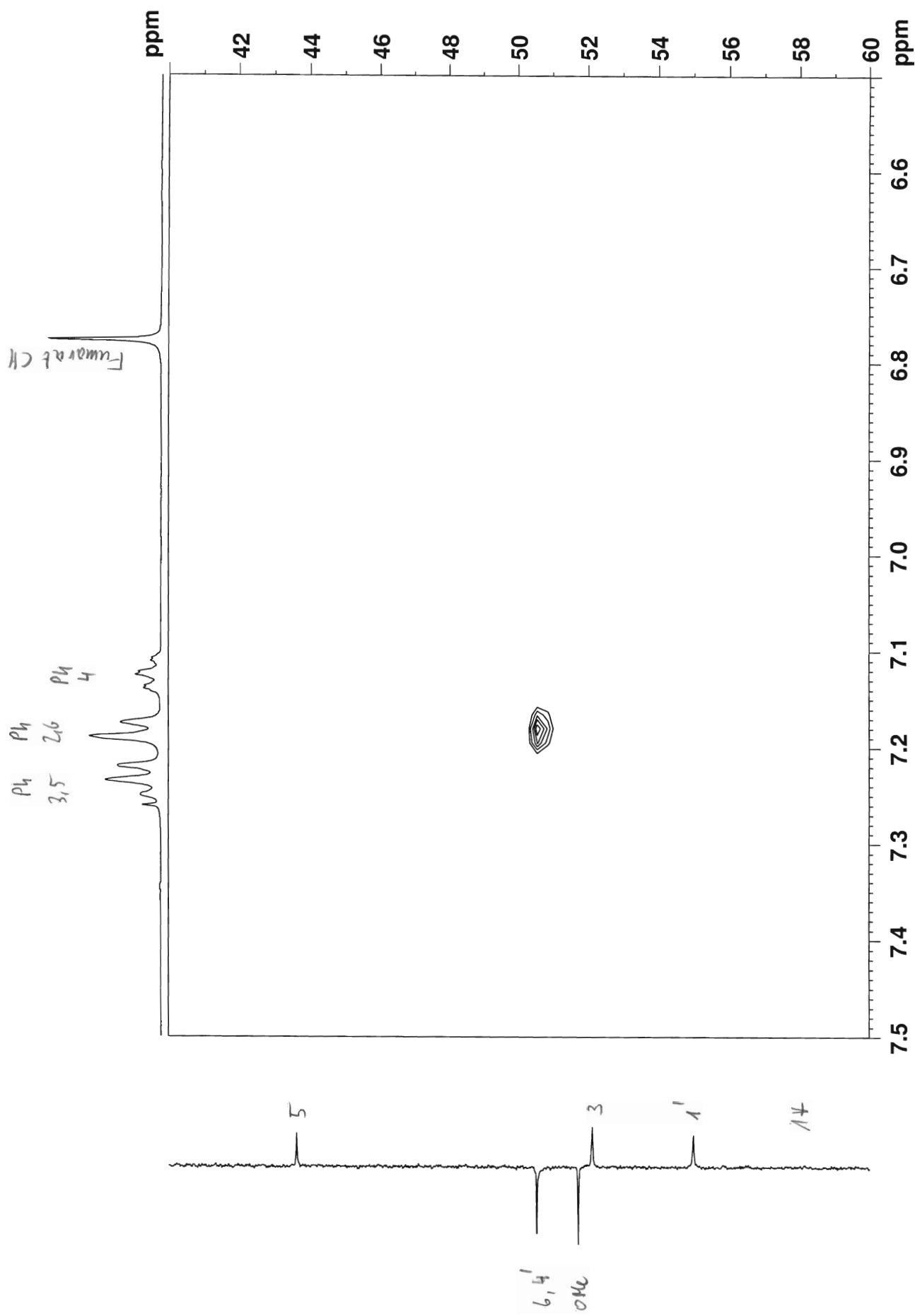
GABA 1d in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



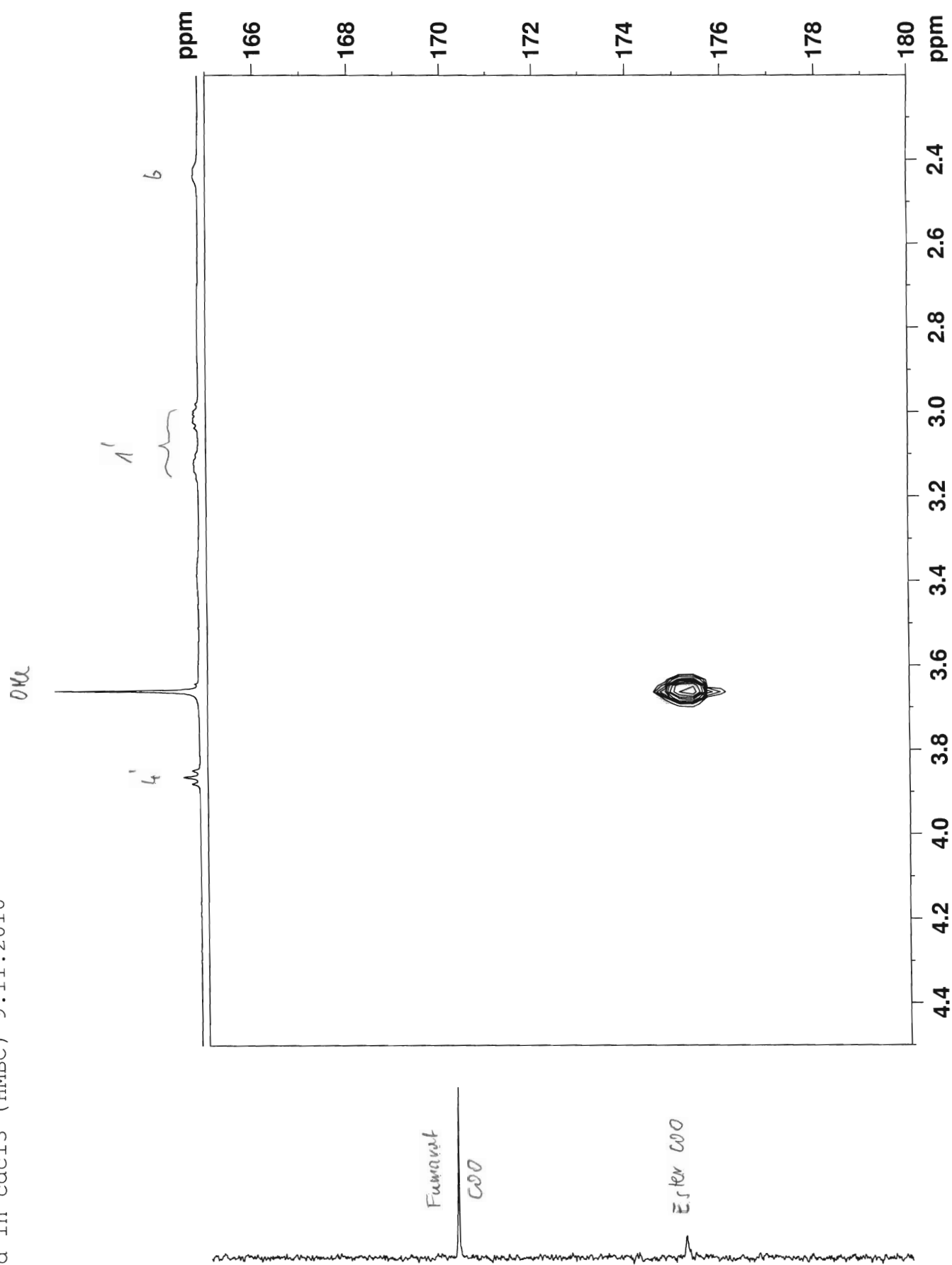


GABA 1d in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

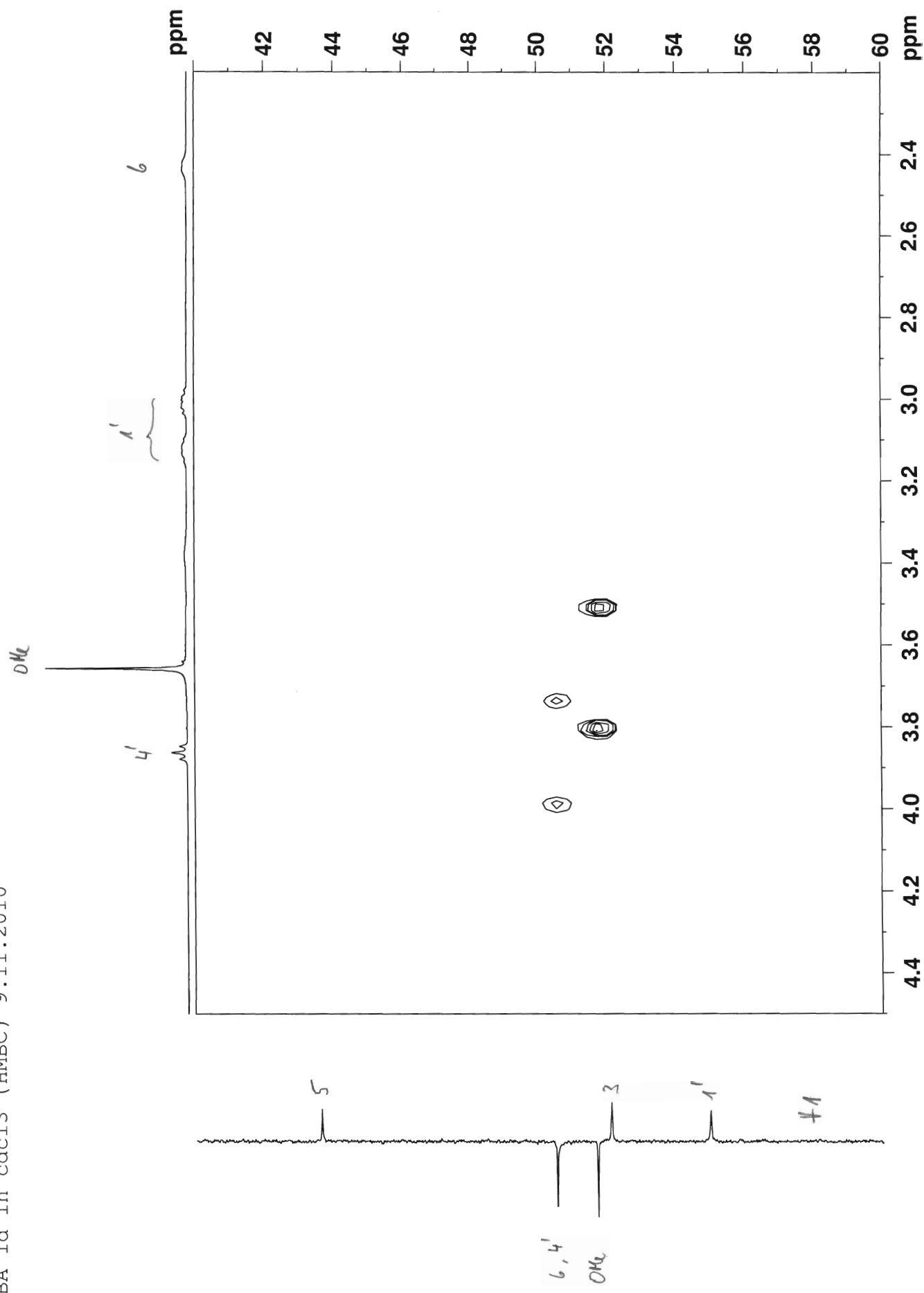


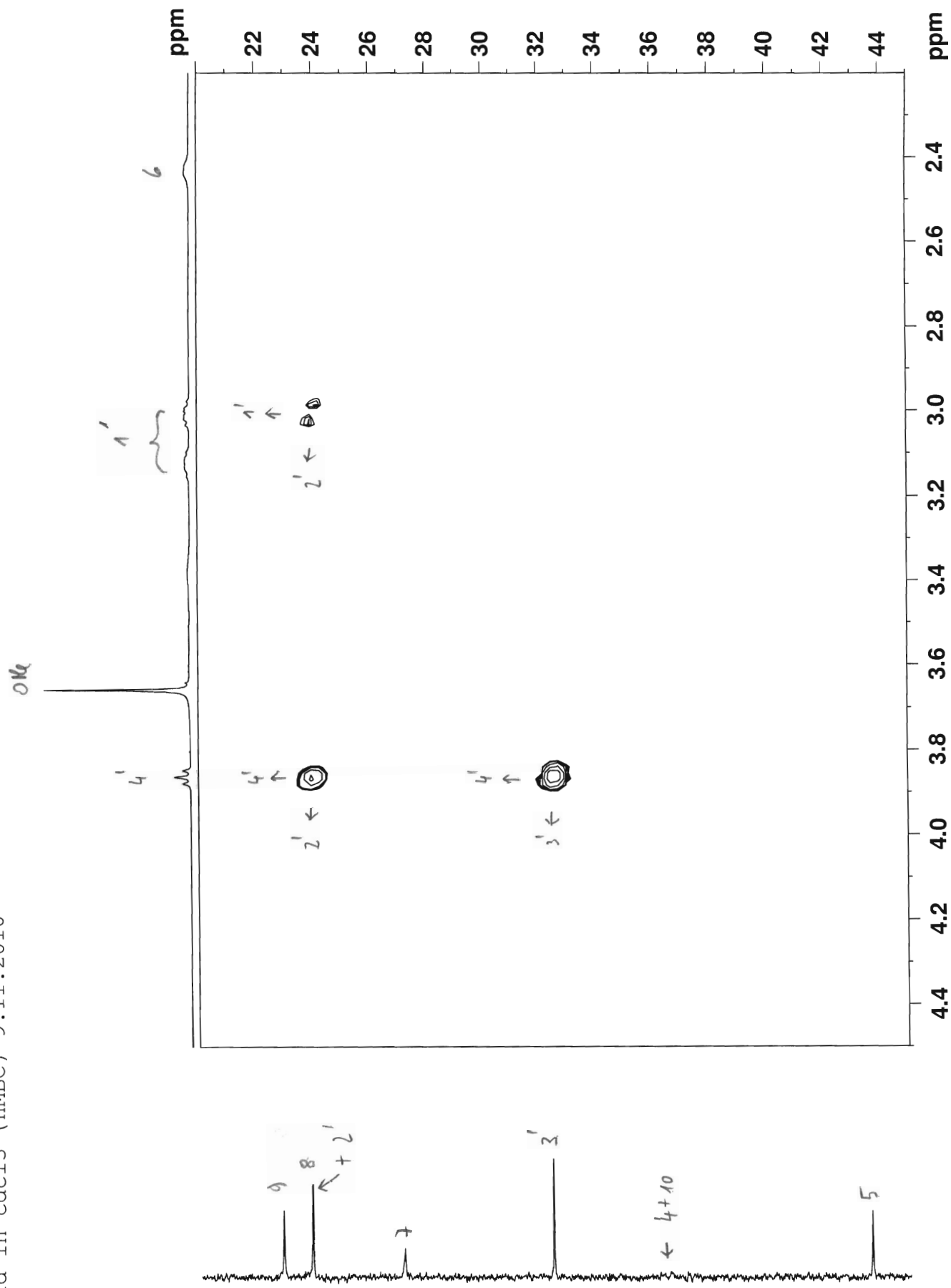


GABA 1d in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

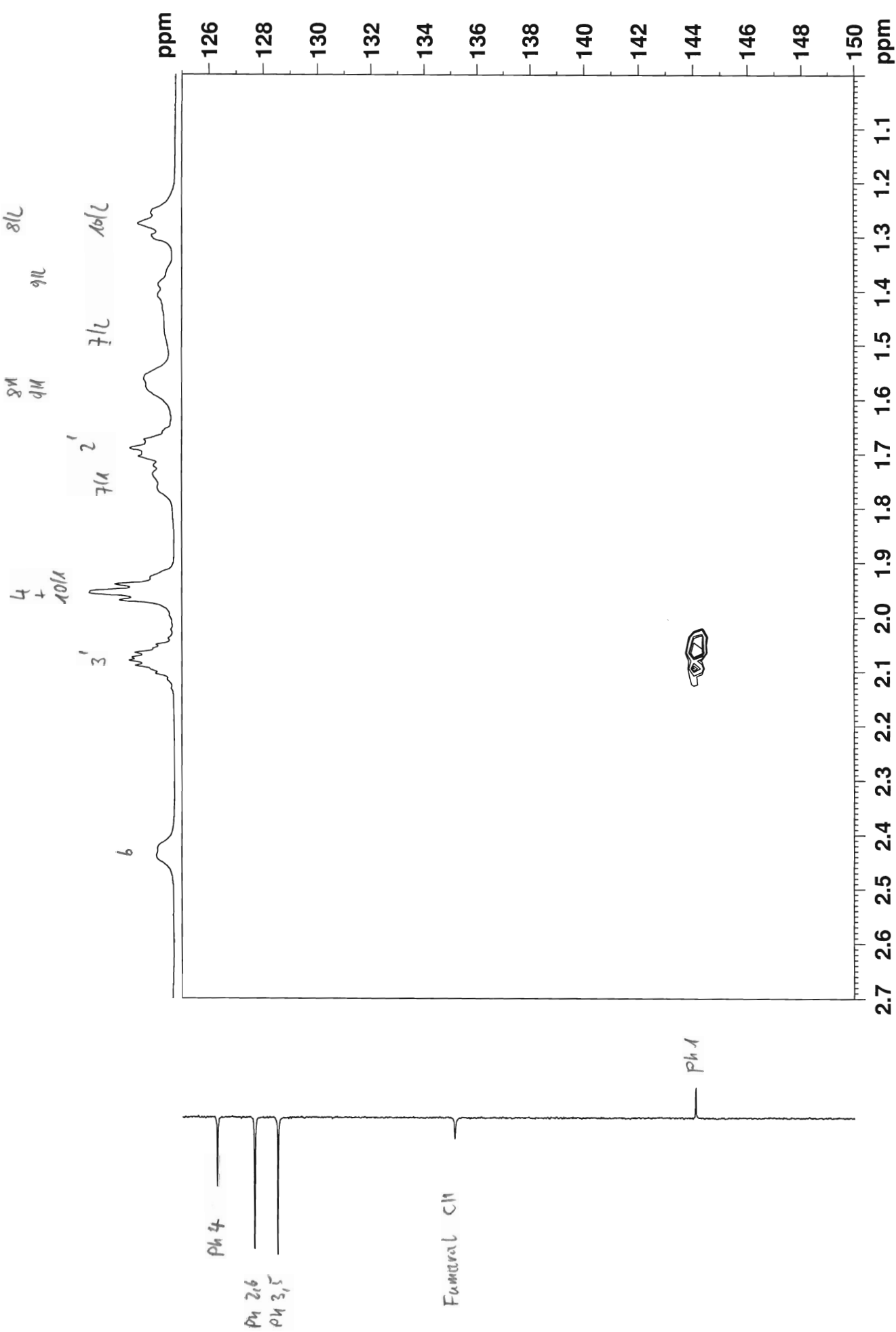


GABA 1d in cdc13 (HMBC) 9.11.2010

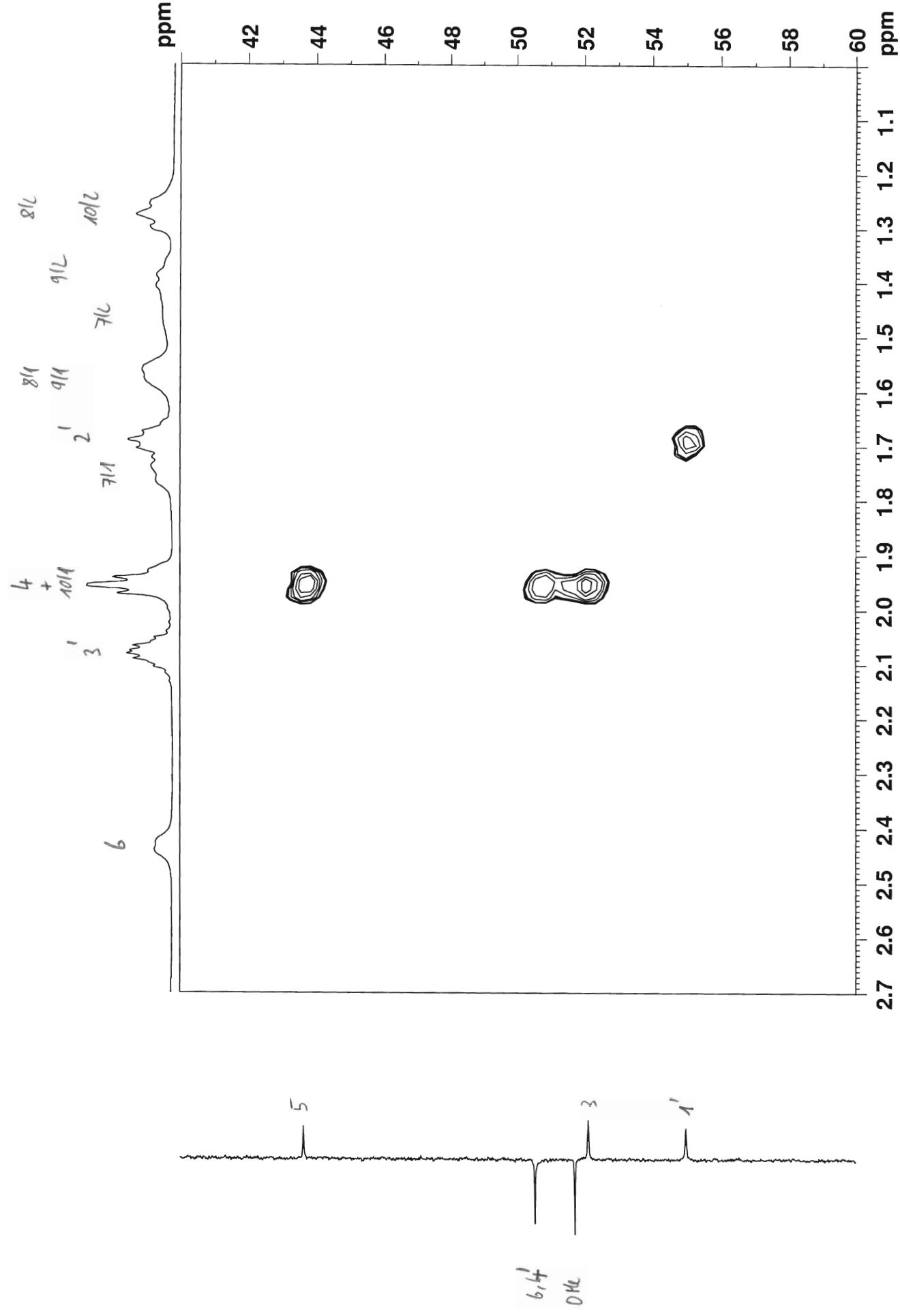


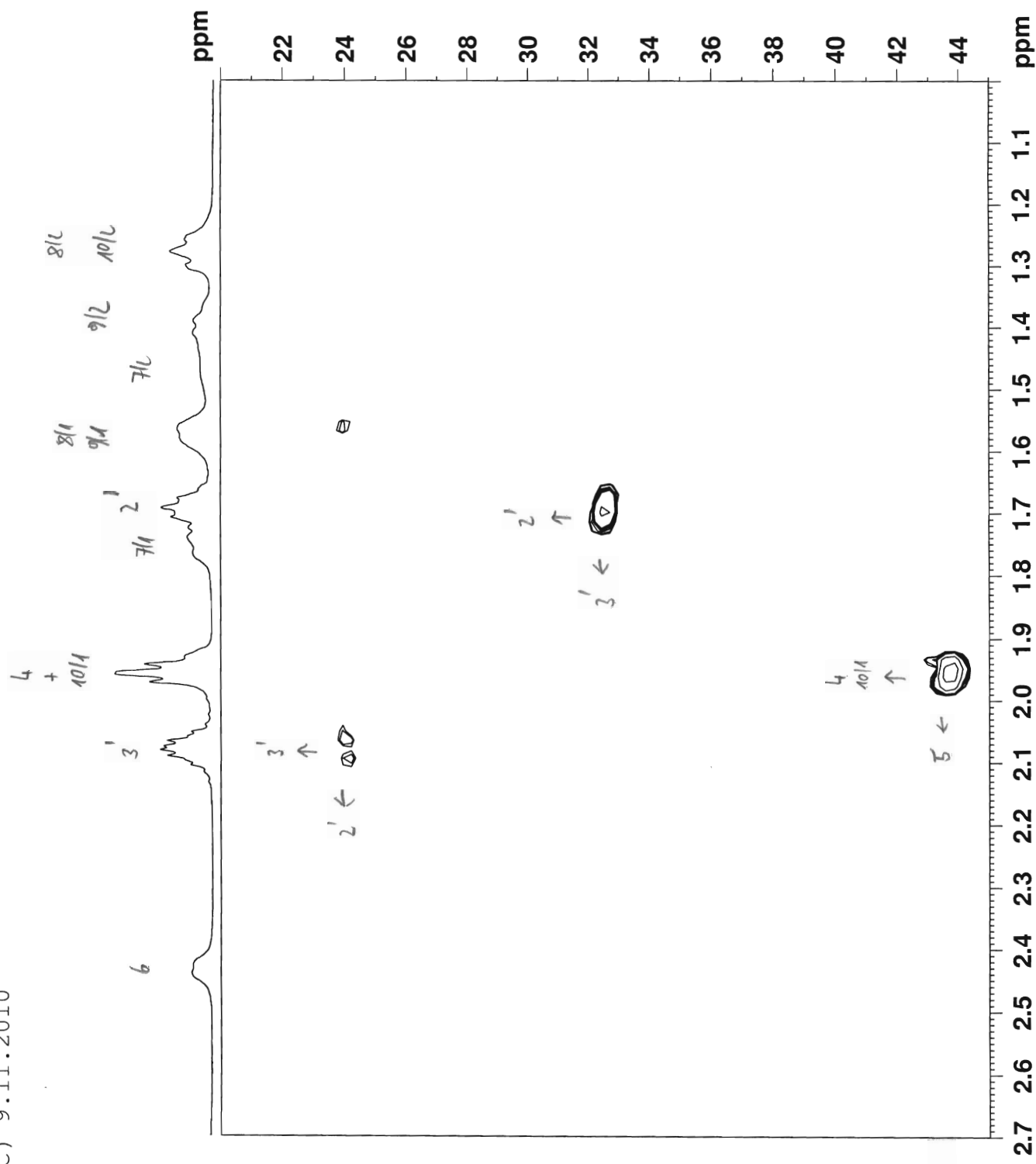


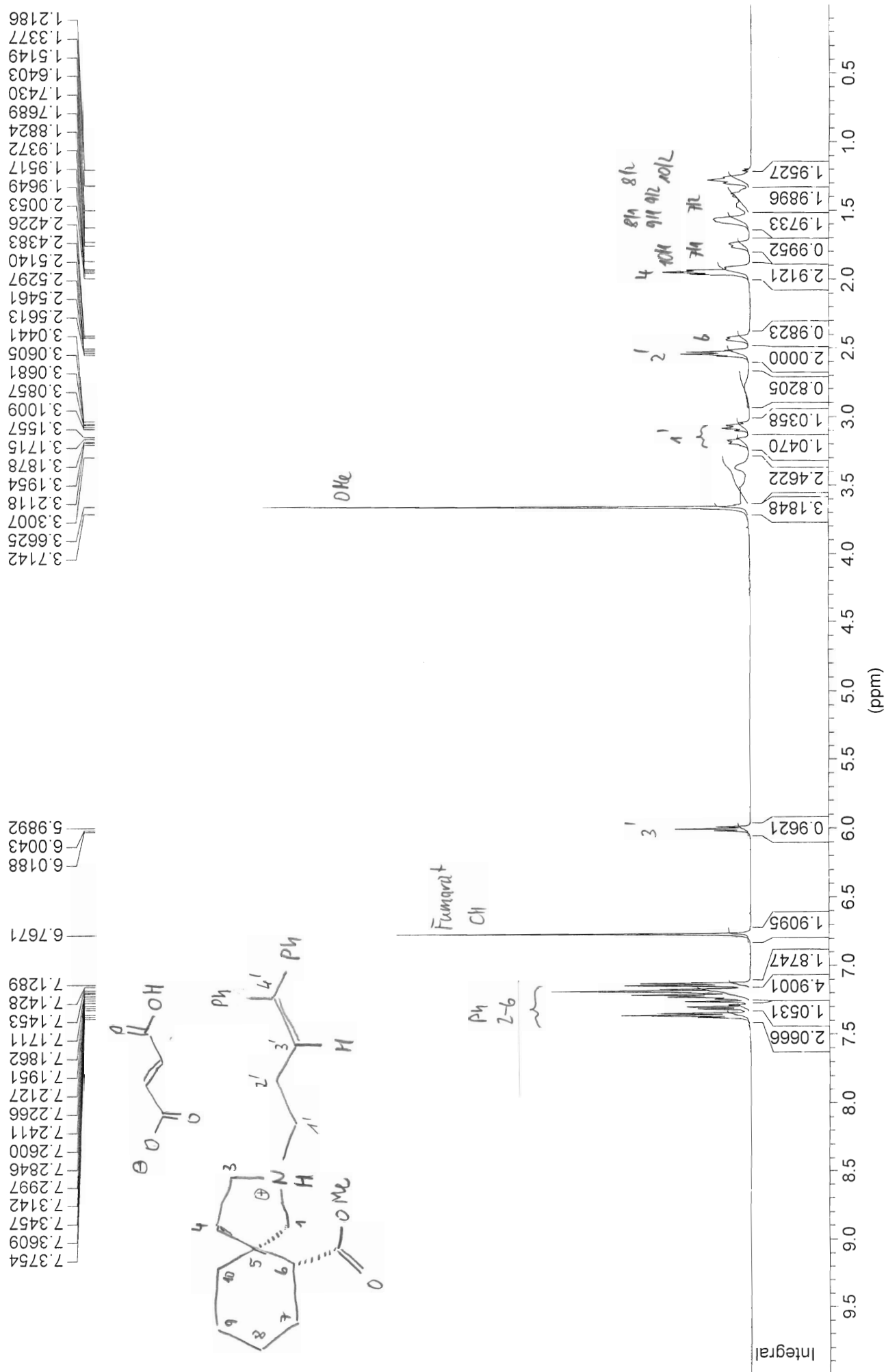
GABA 1d in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

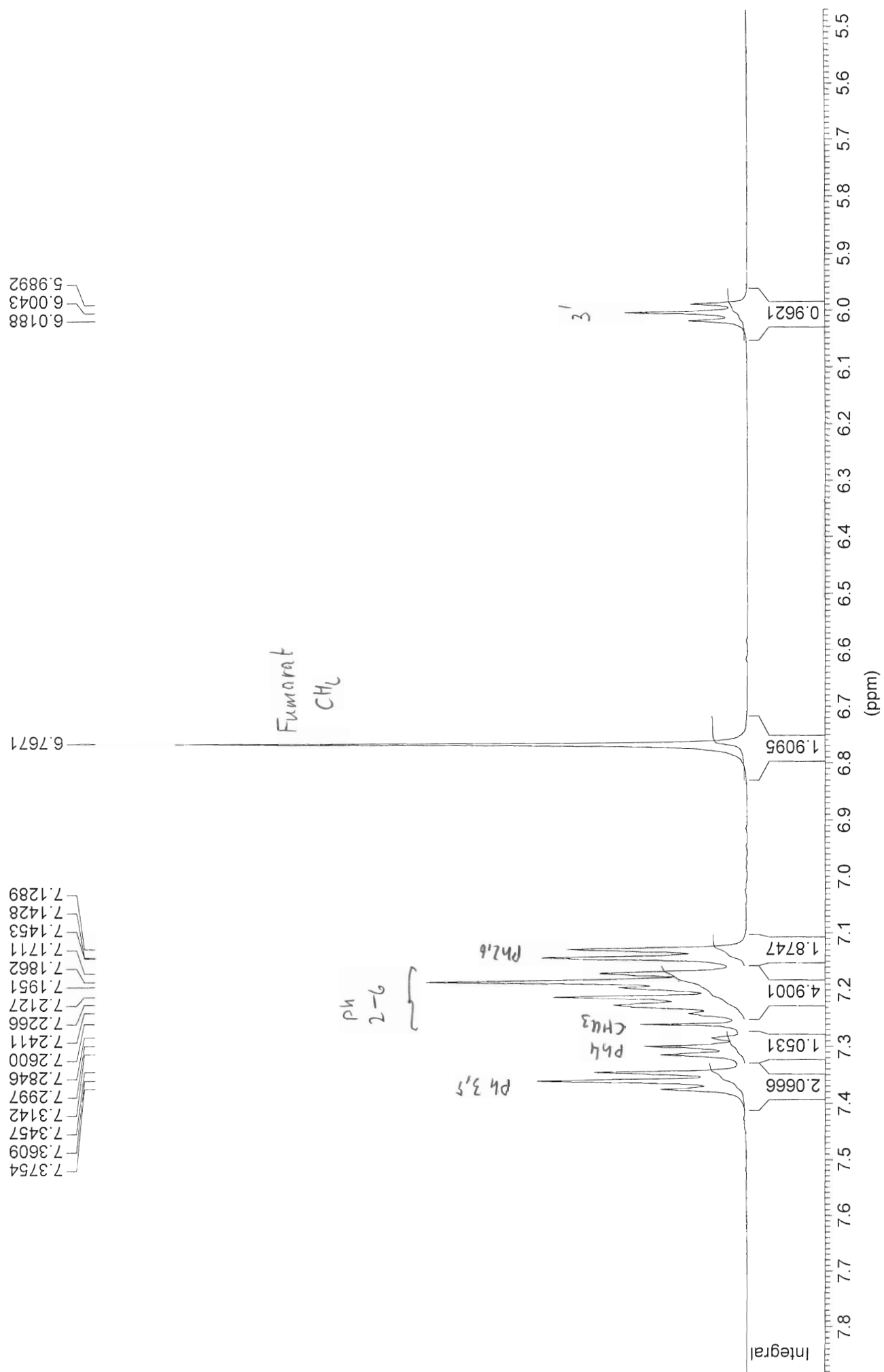


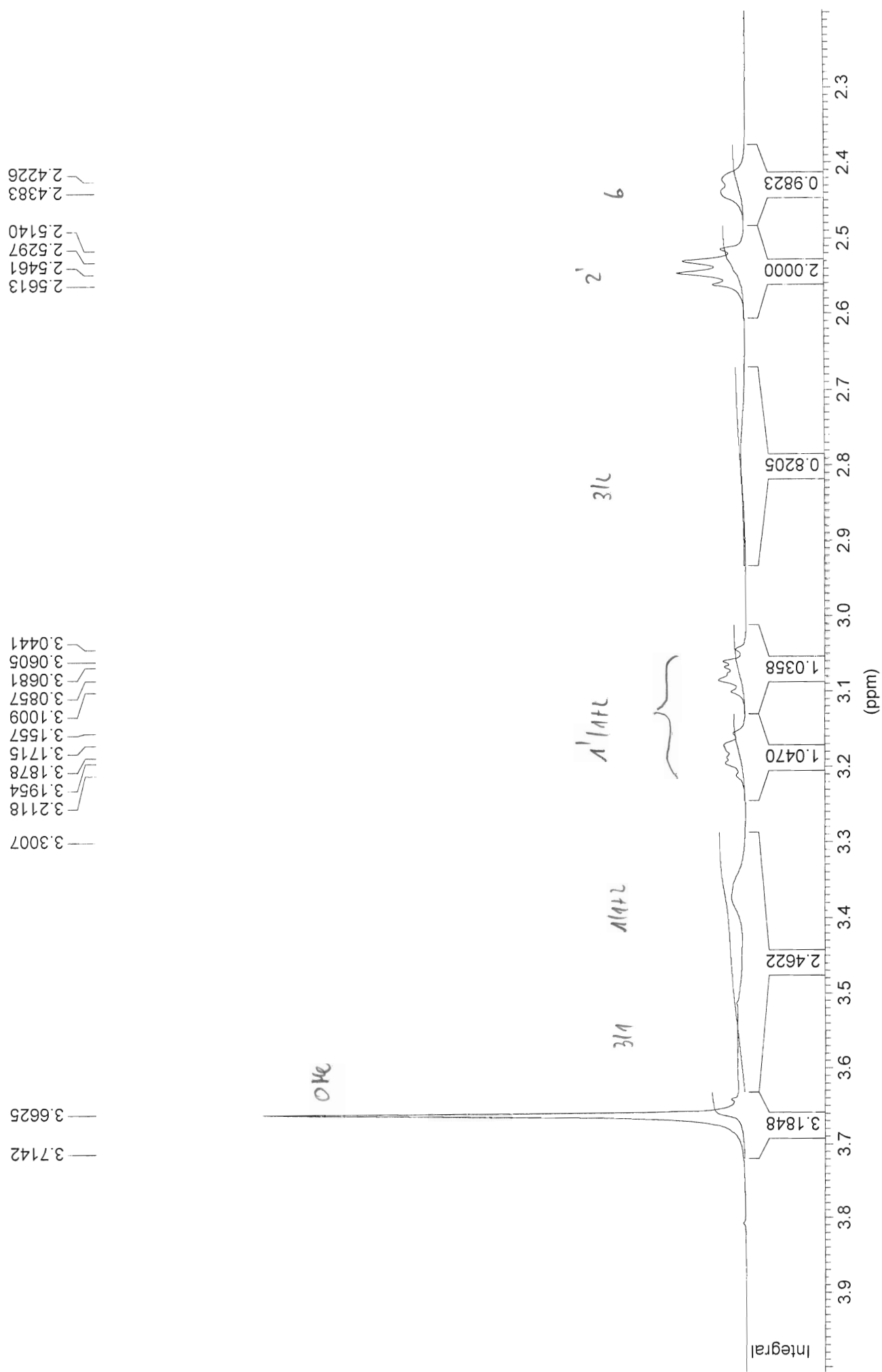
GABA 1d in cdc13 (HMBC) 9.11.2010

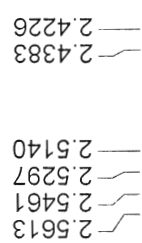
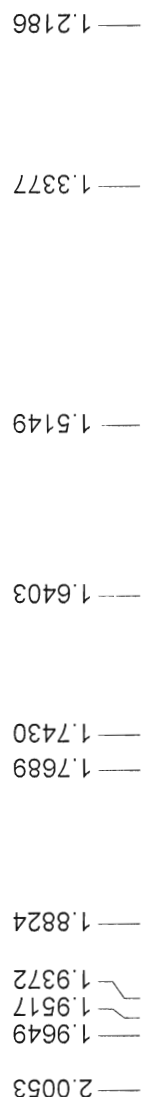


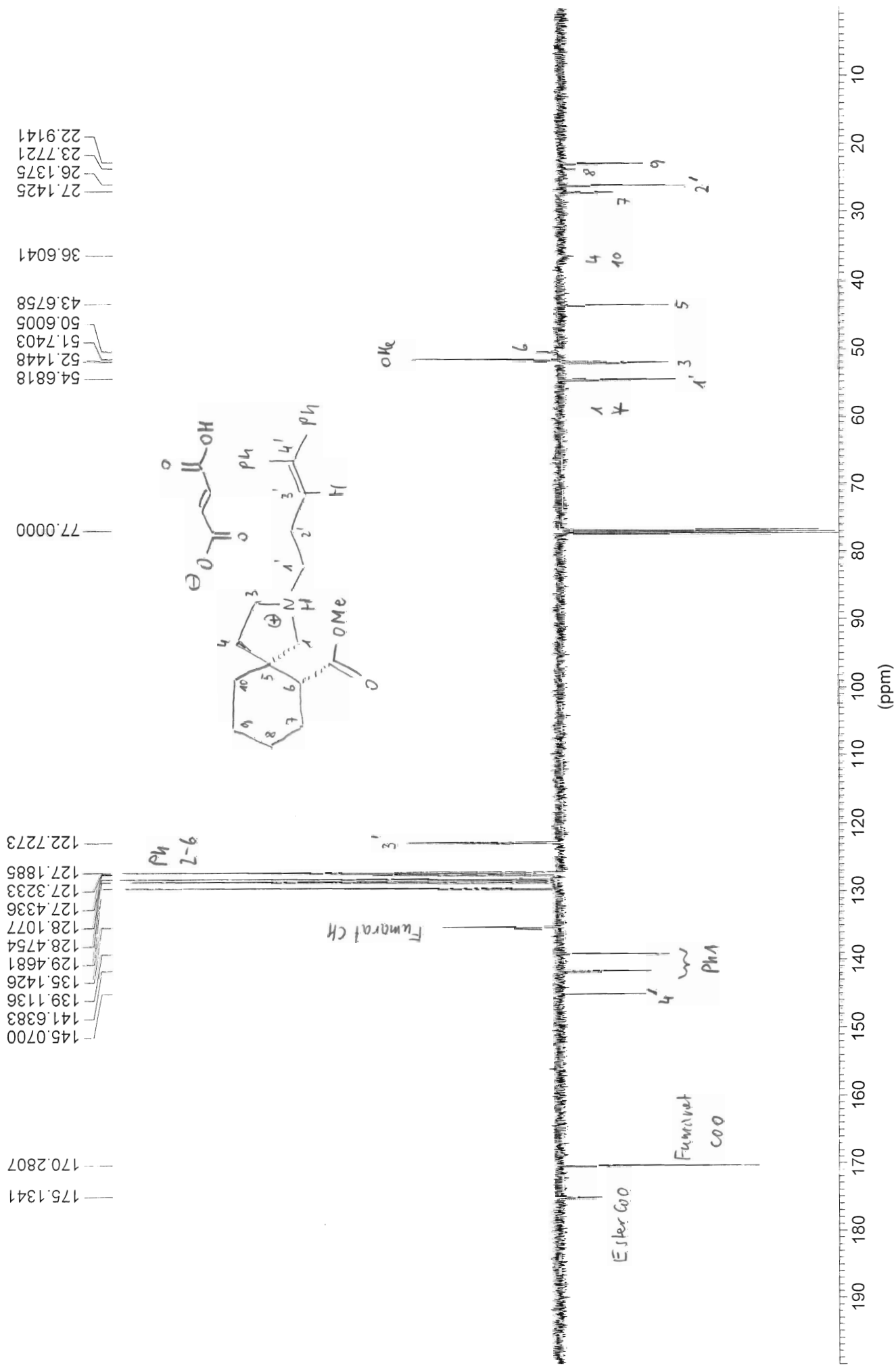


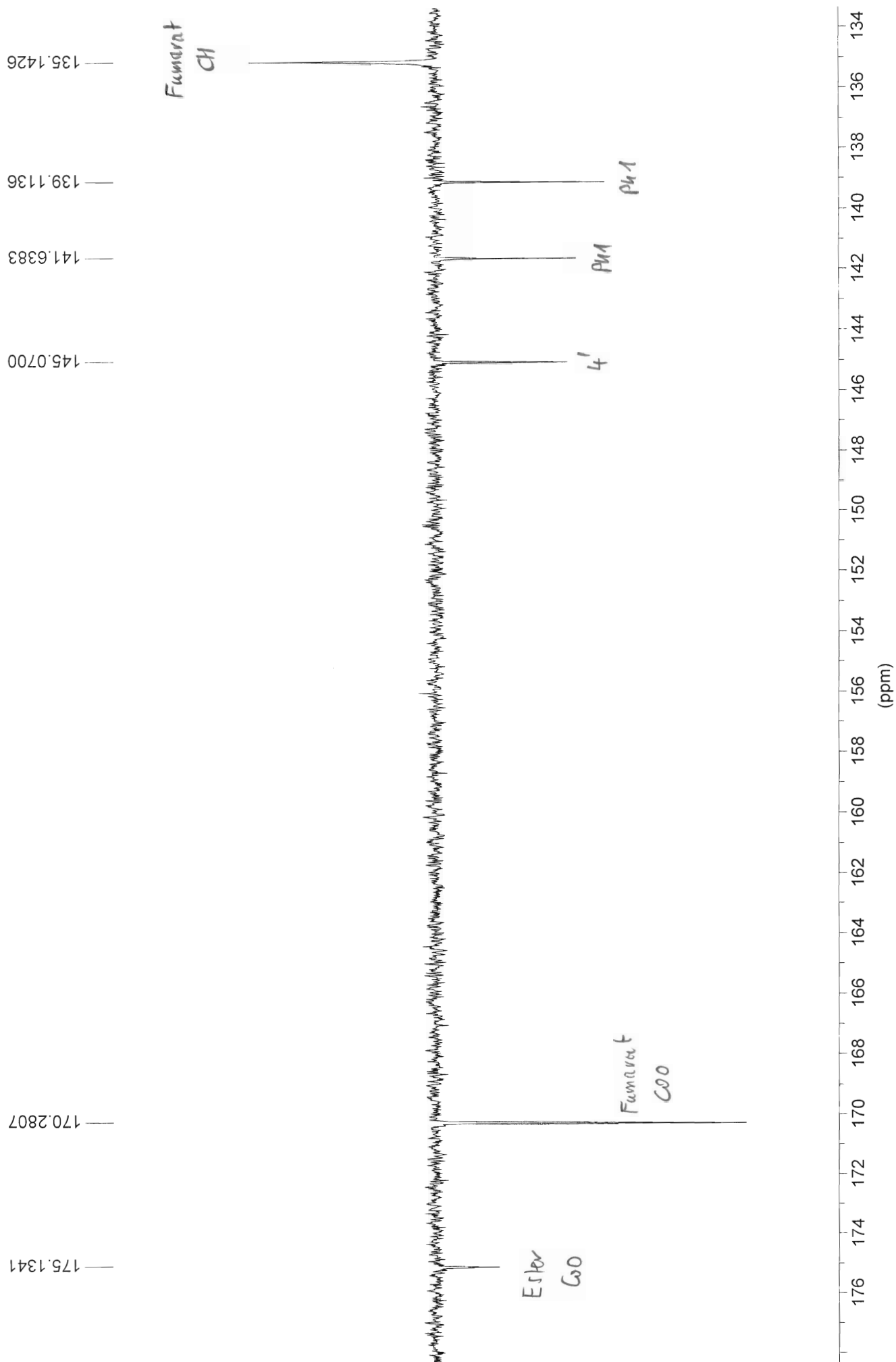


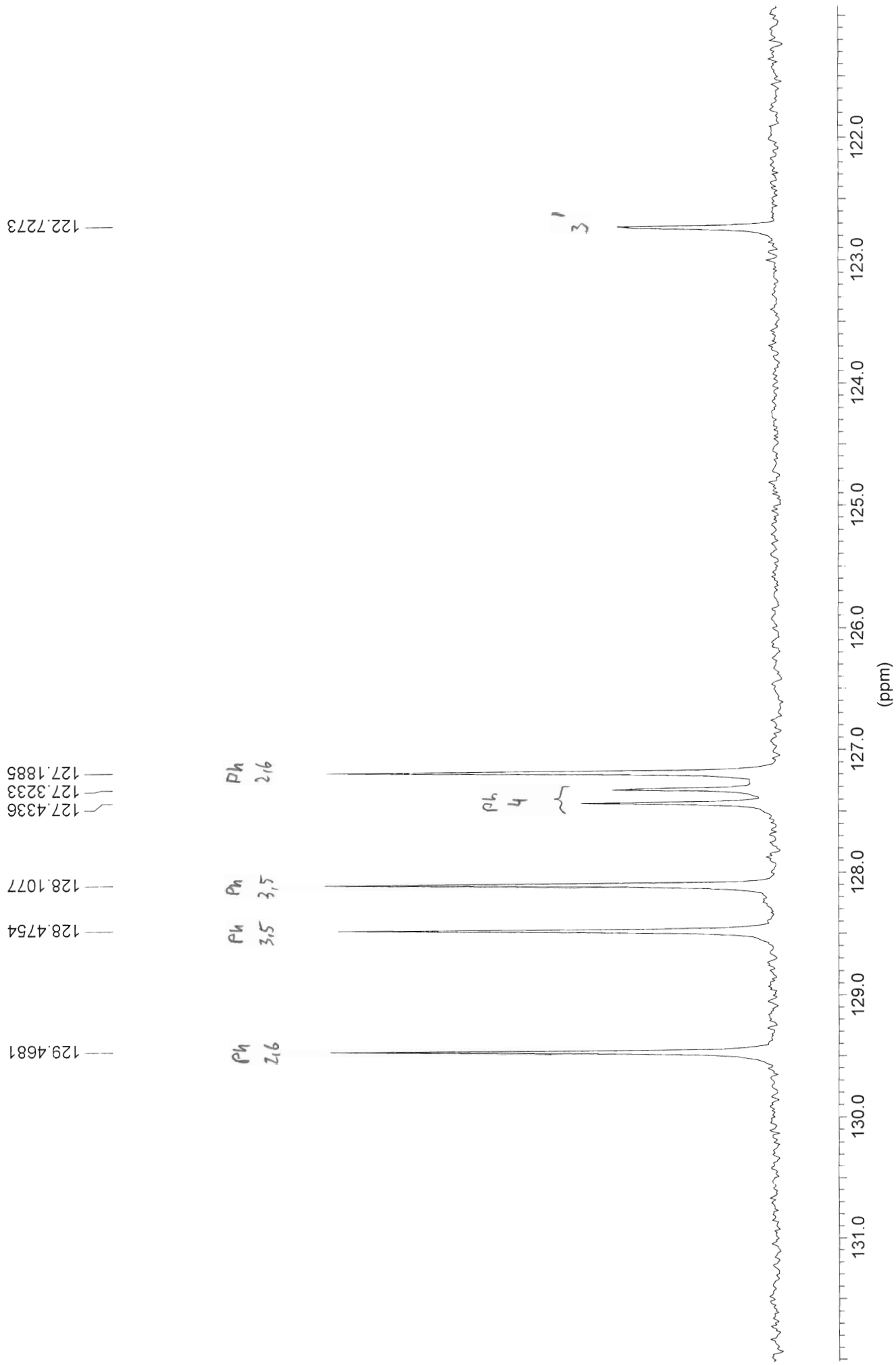


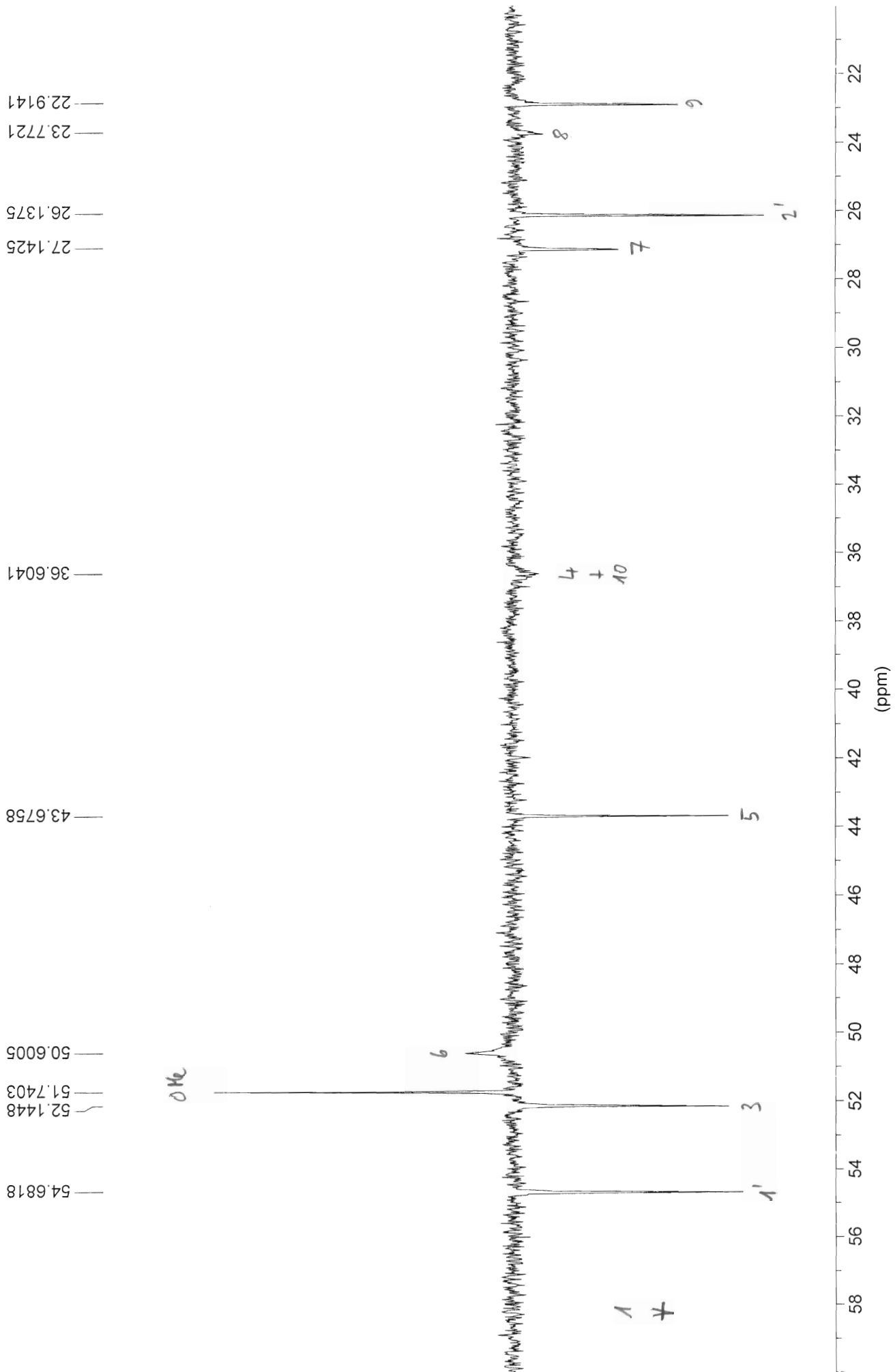




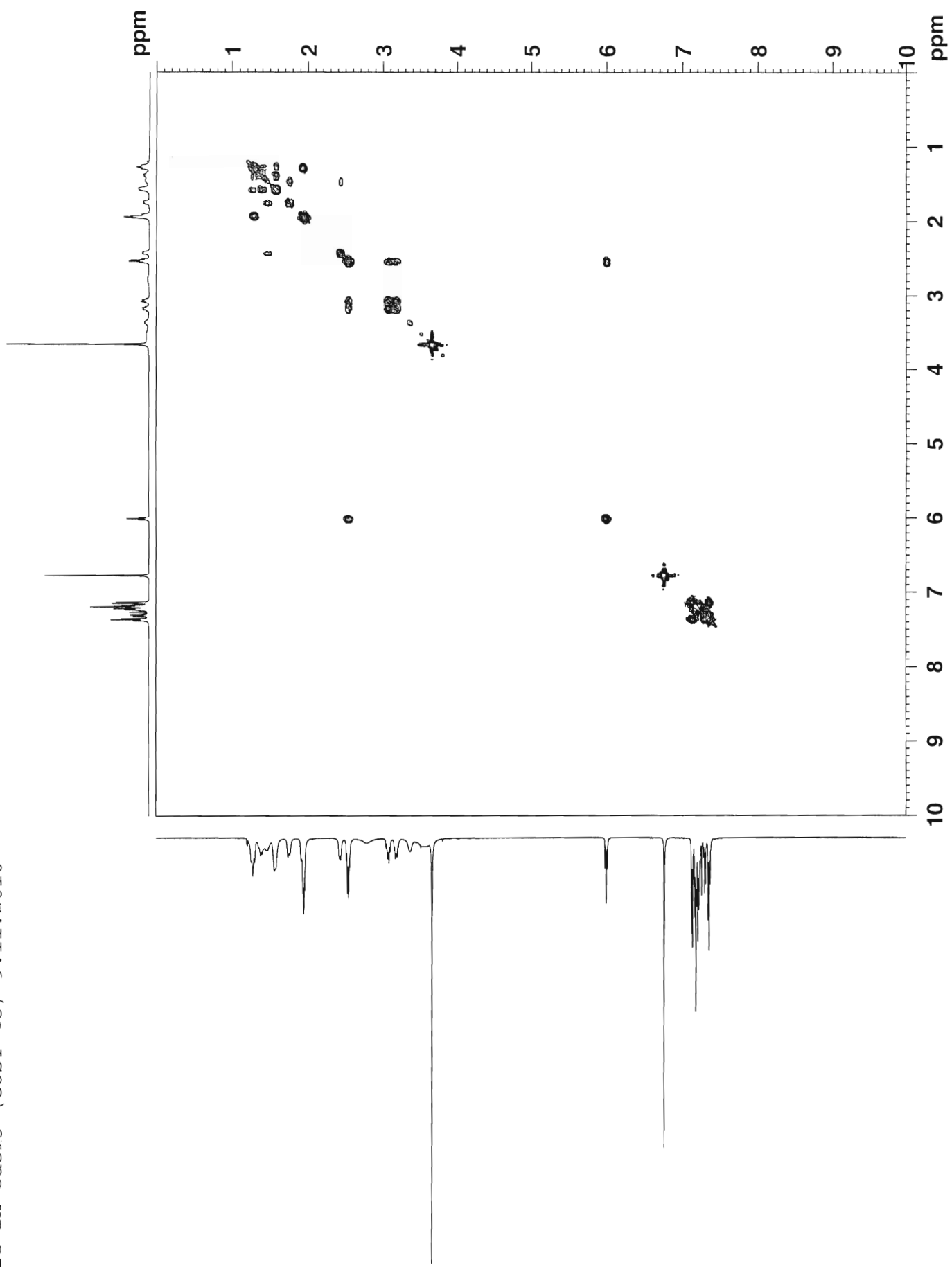


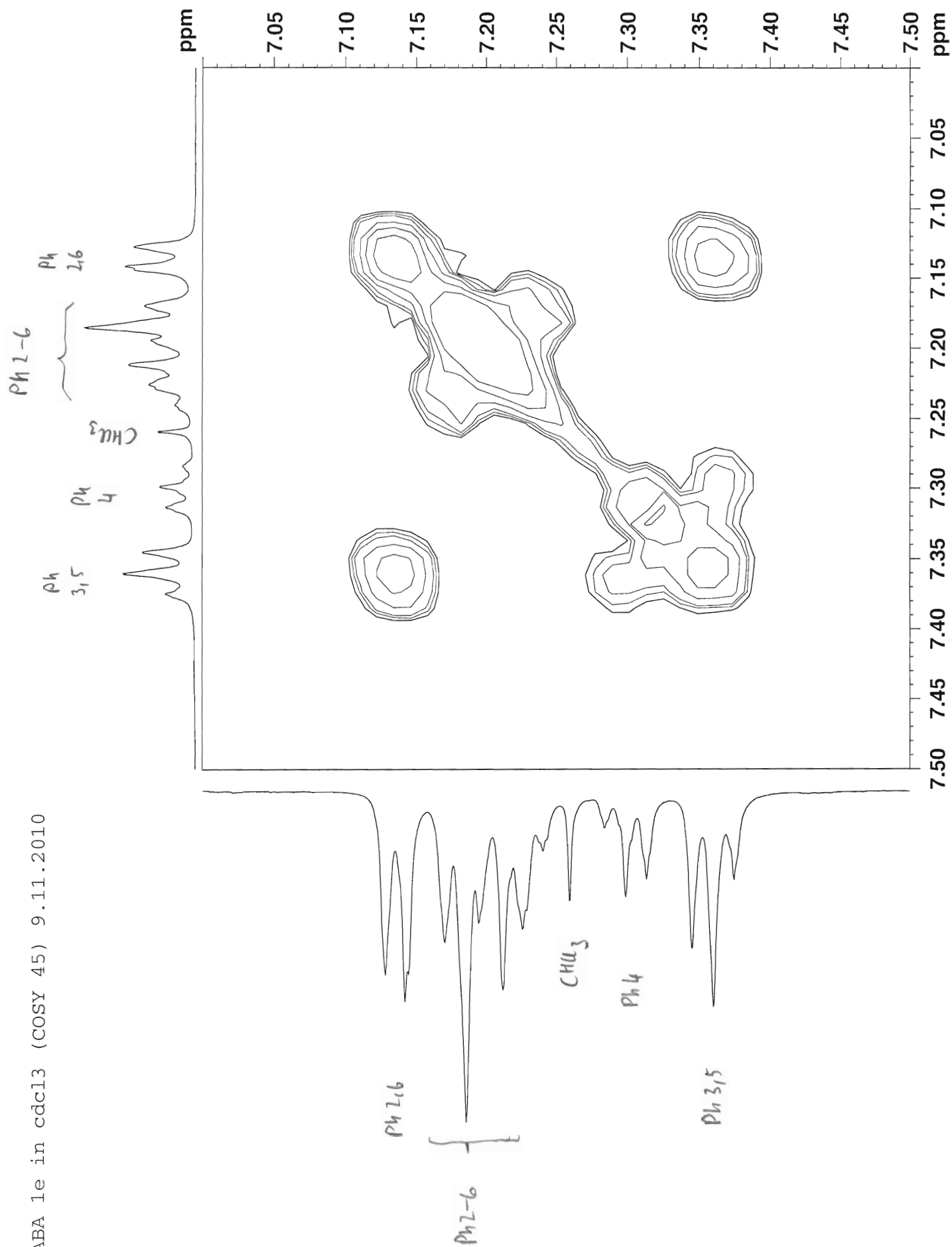


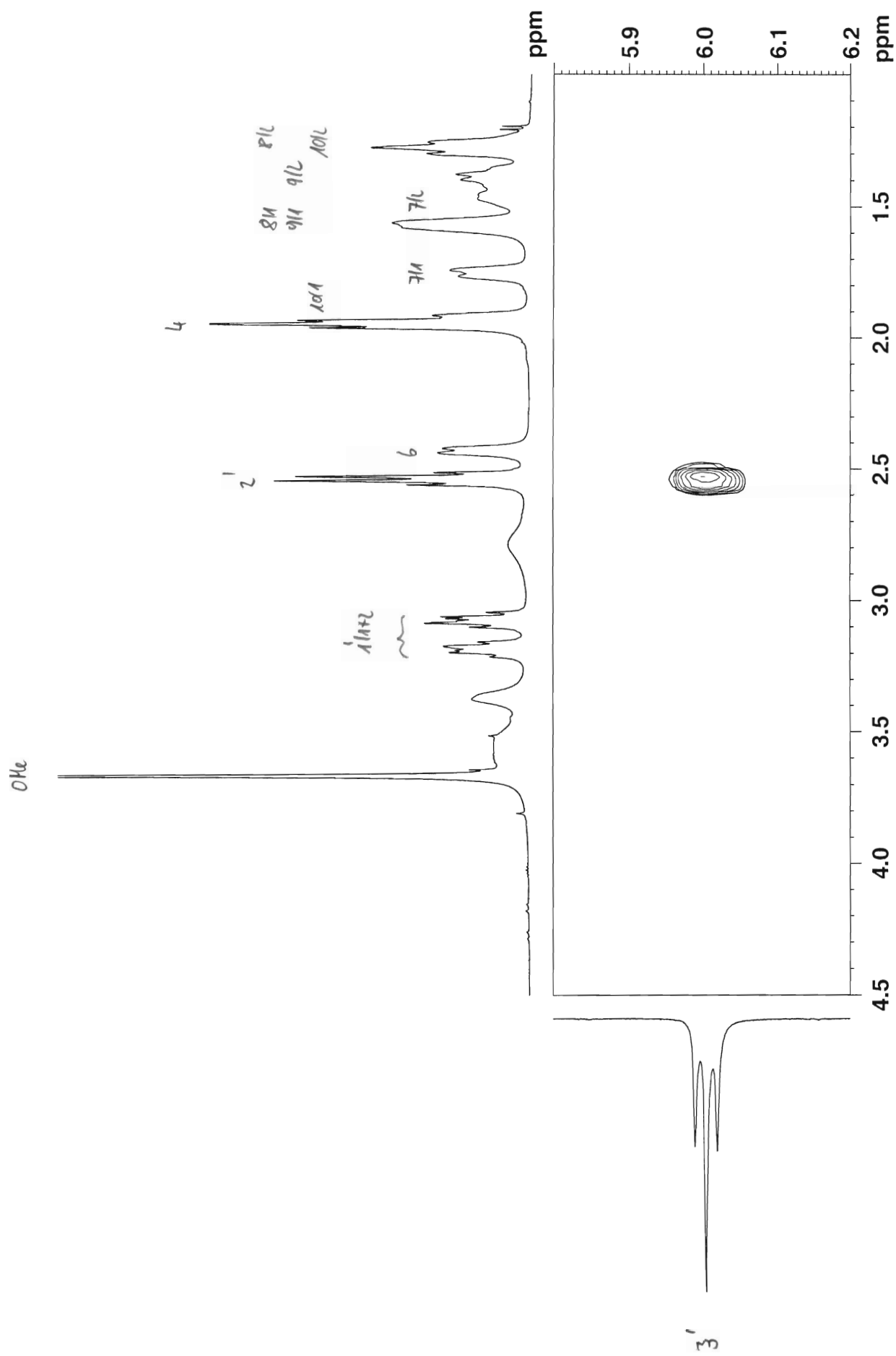


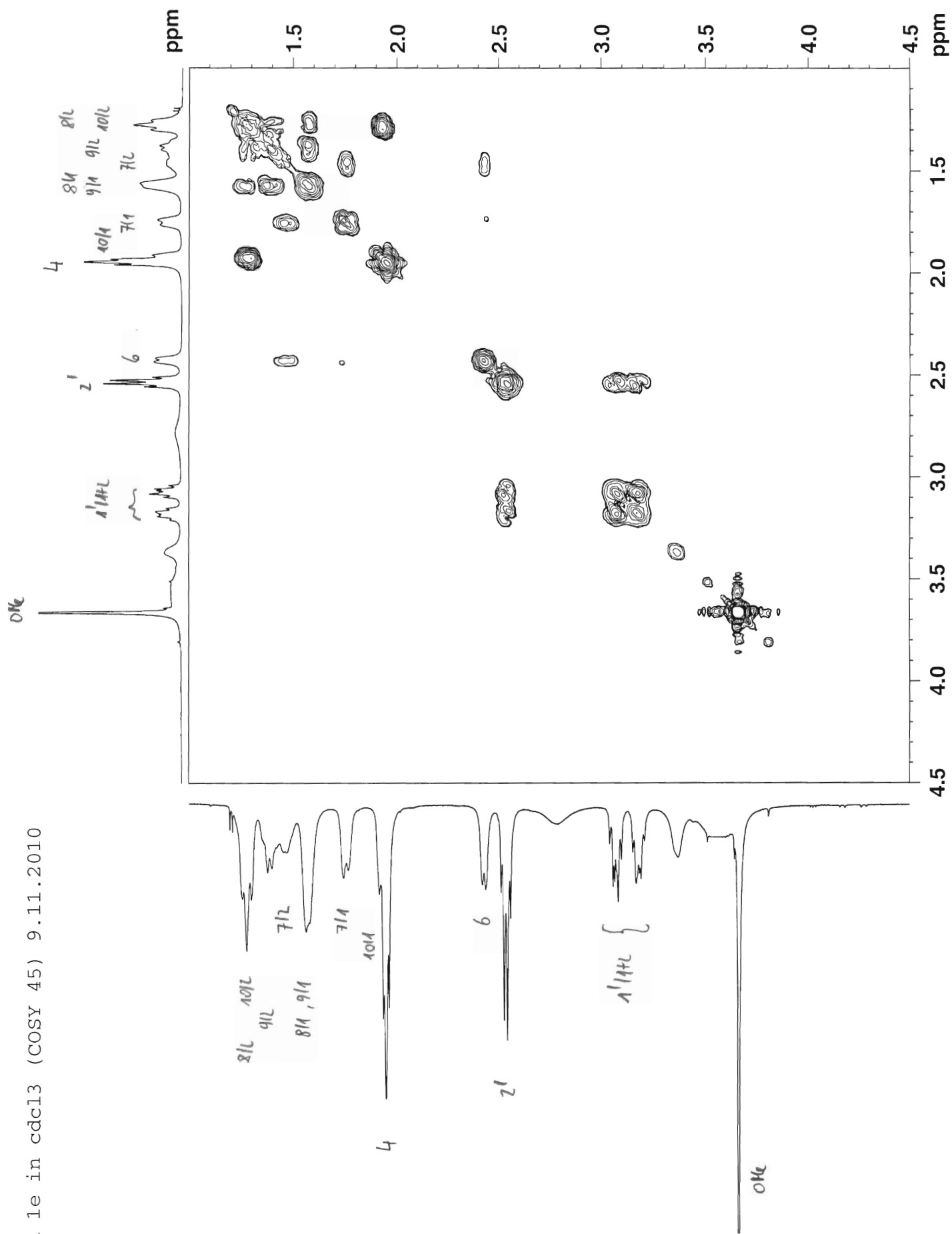


GABA 1e in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010

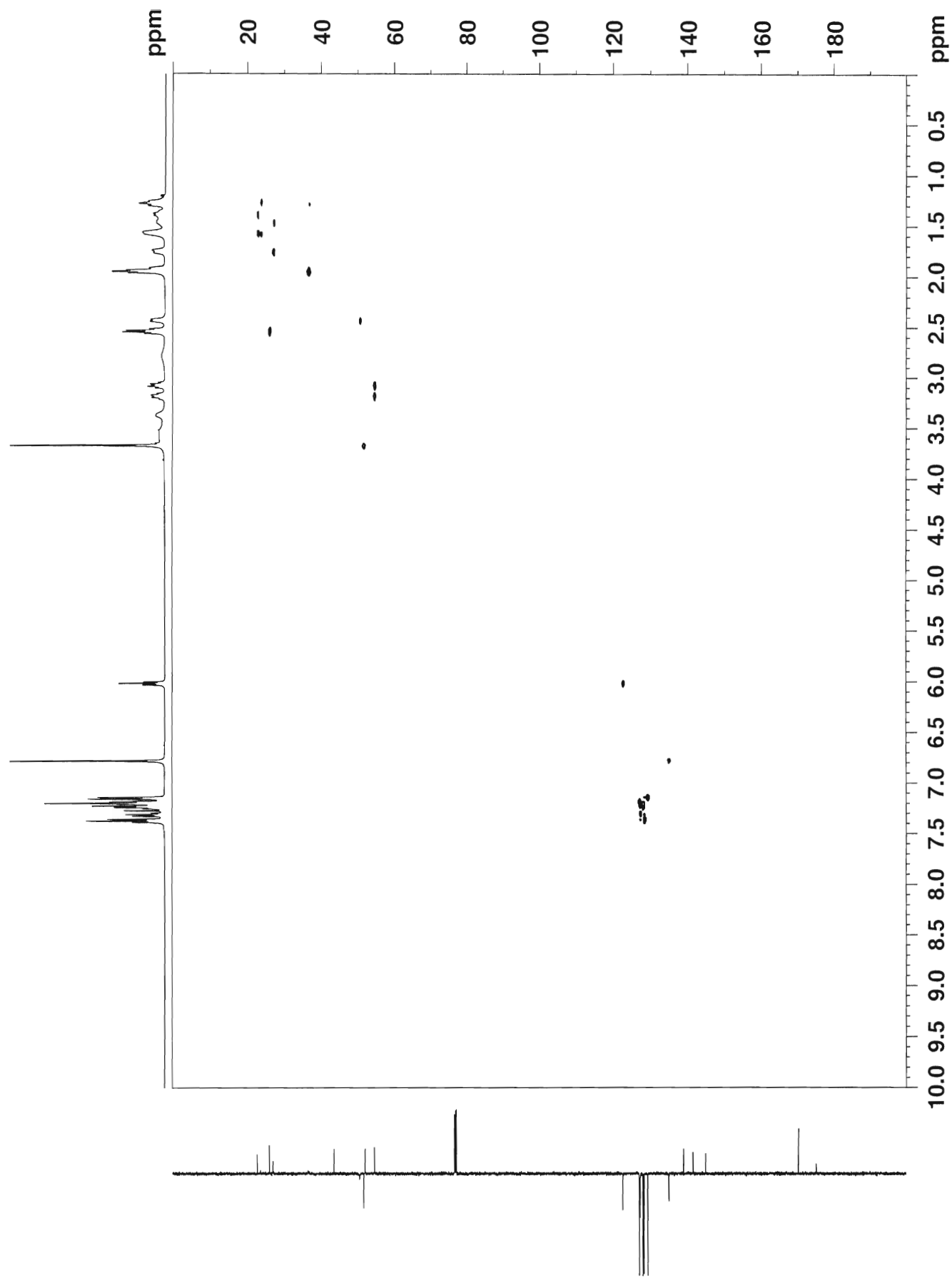


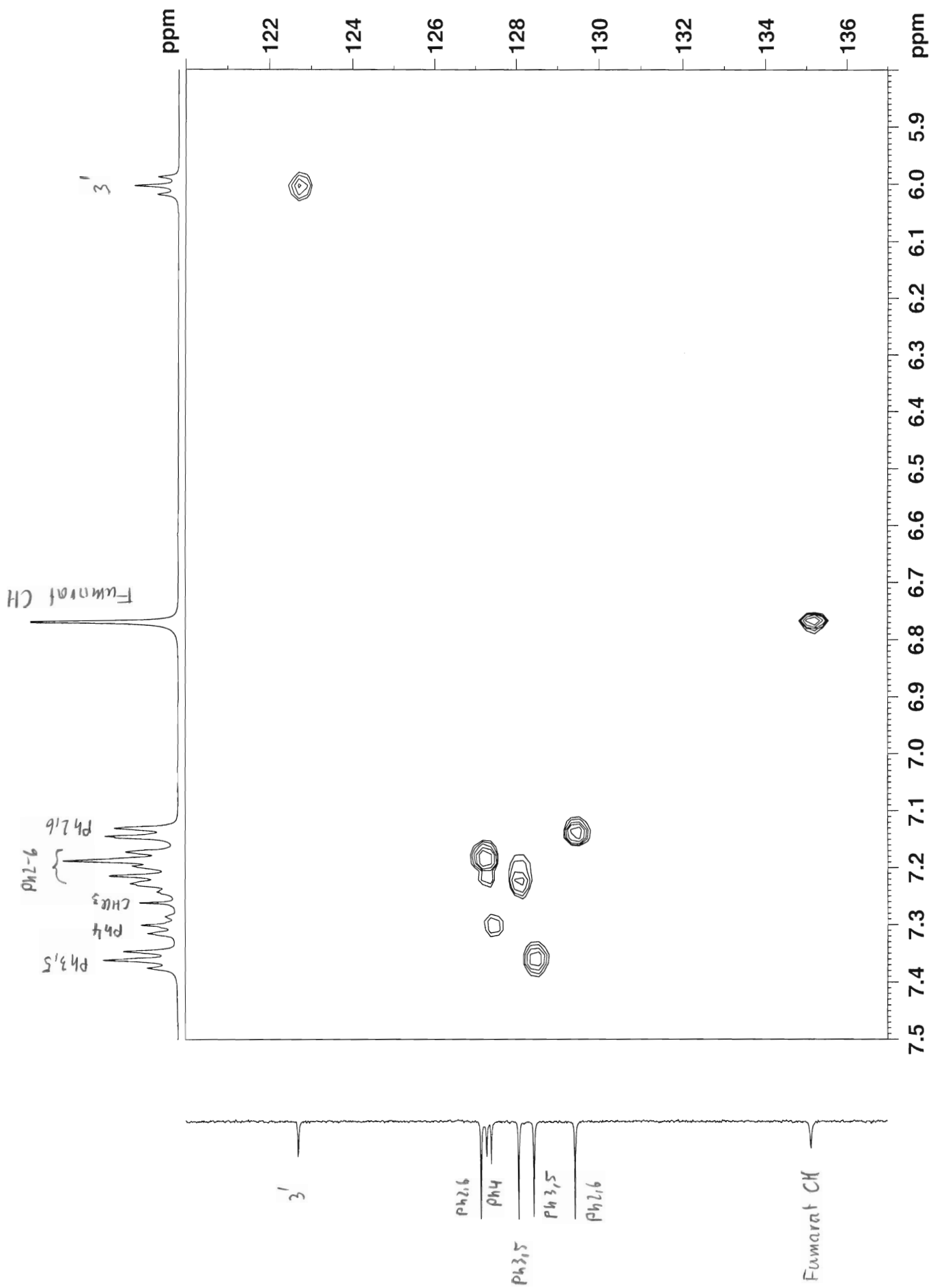




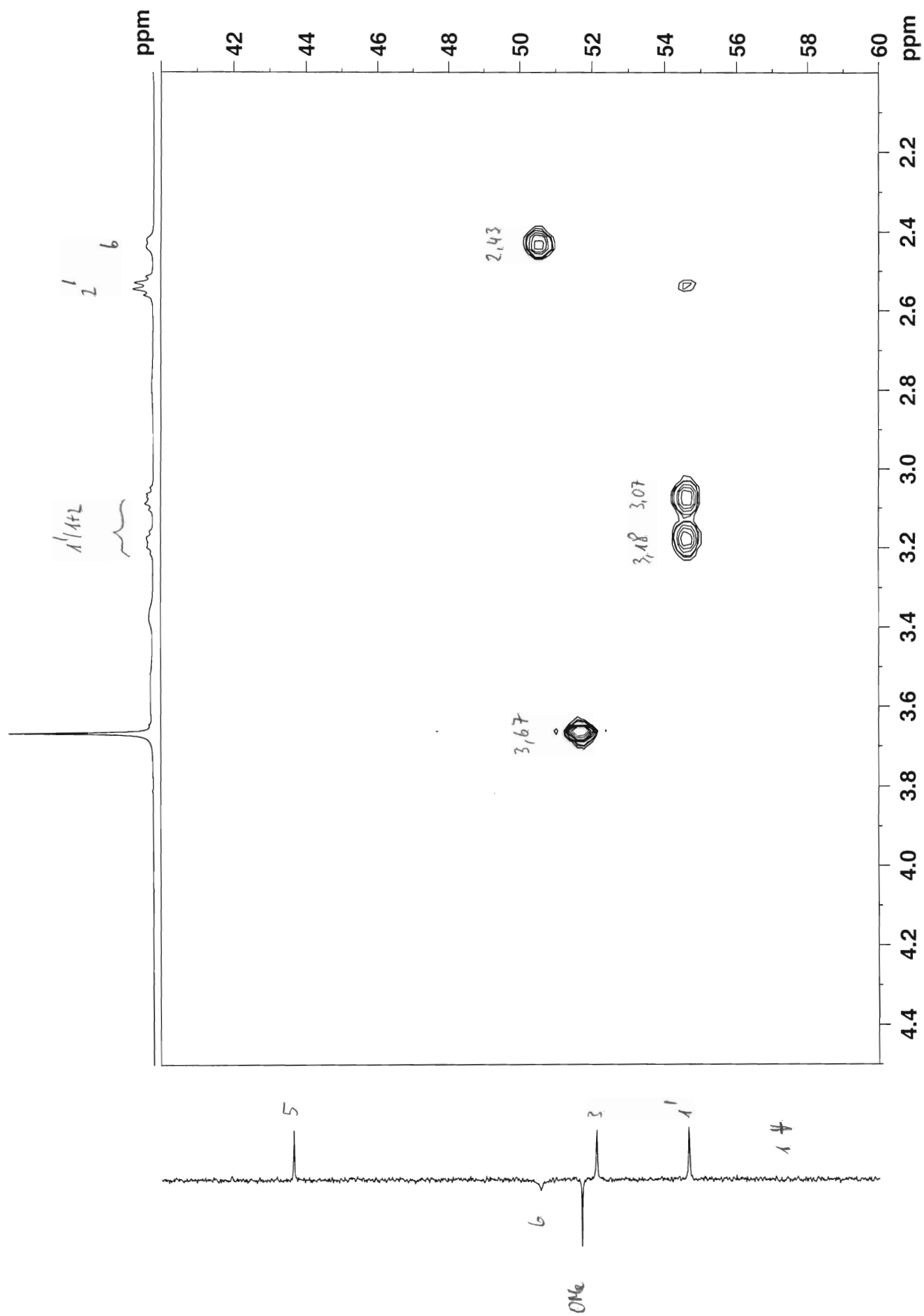


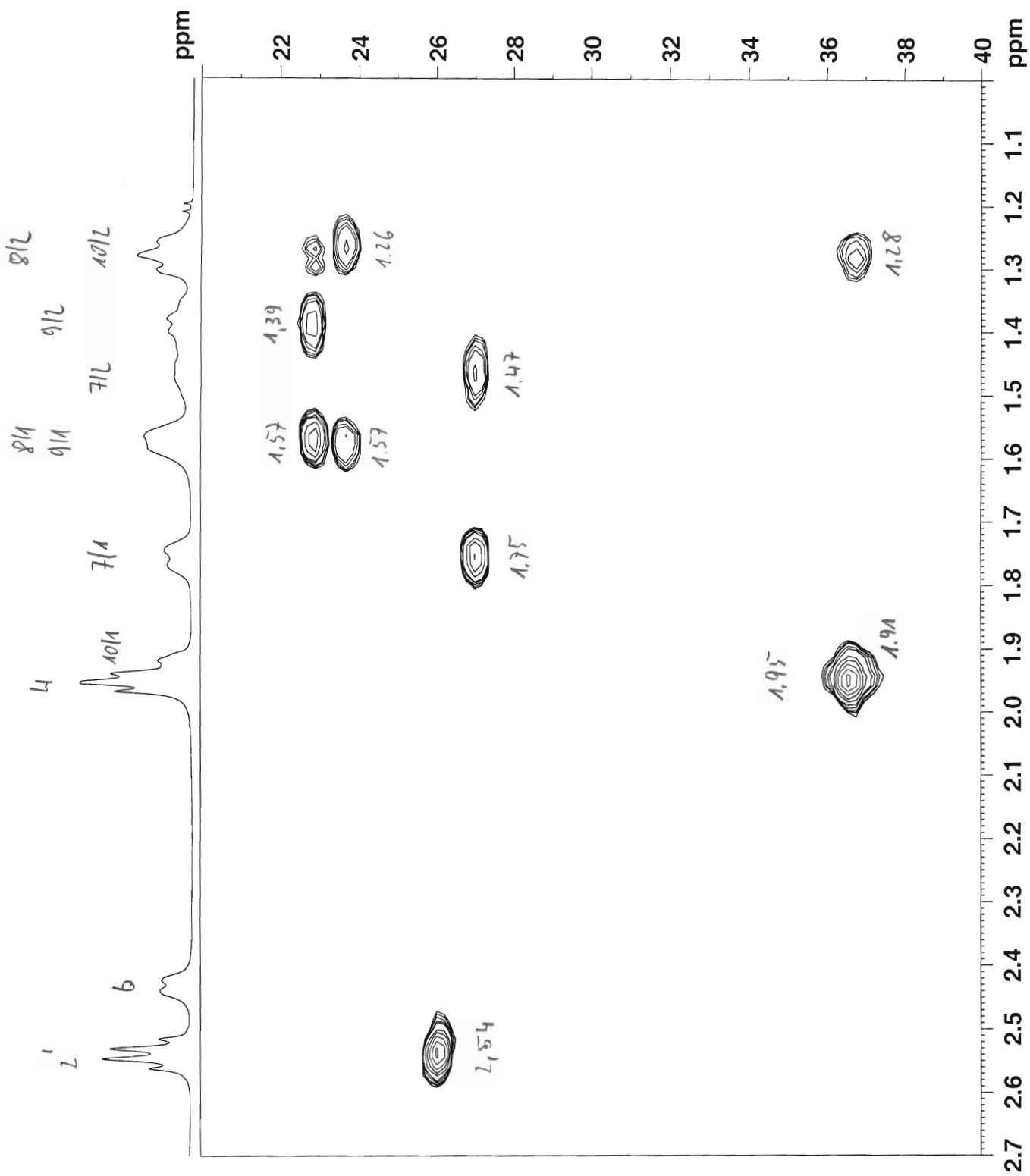
GABA 1e in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010



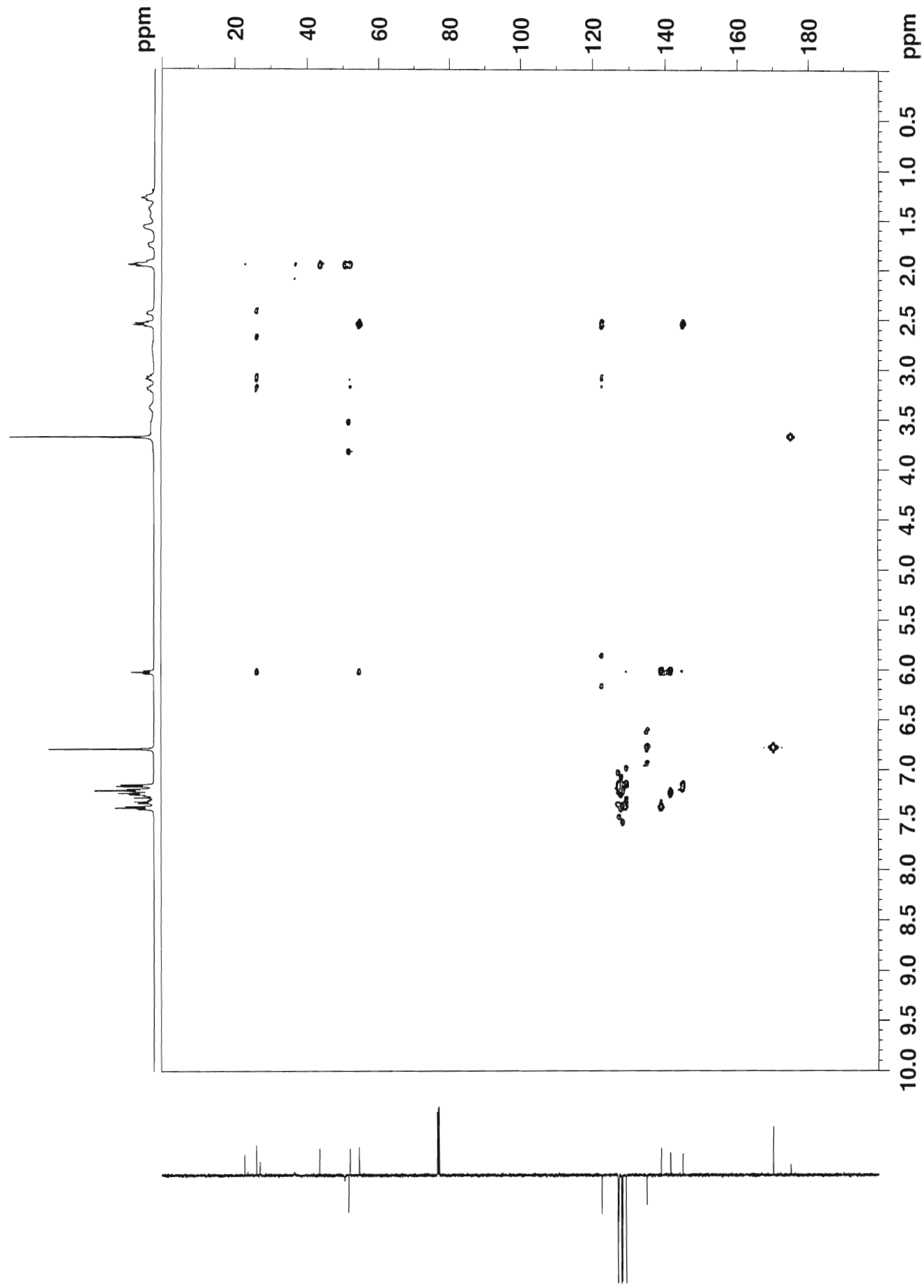


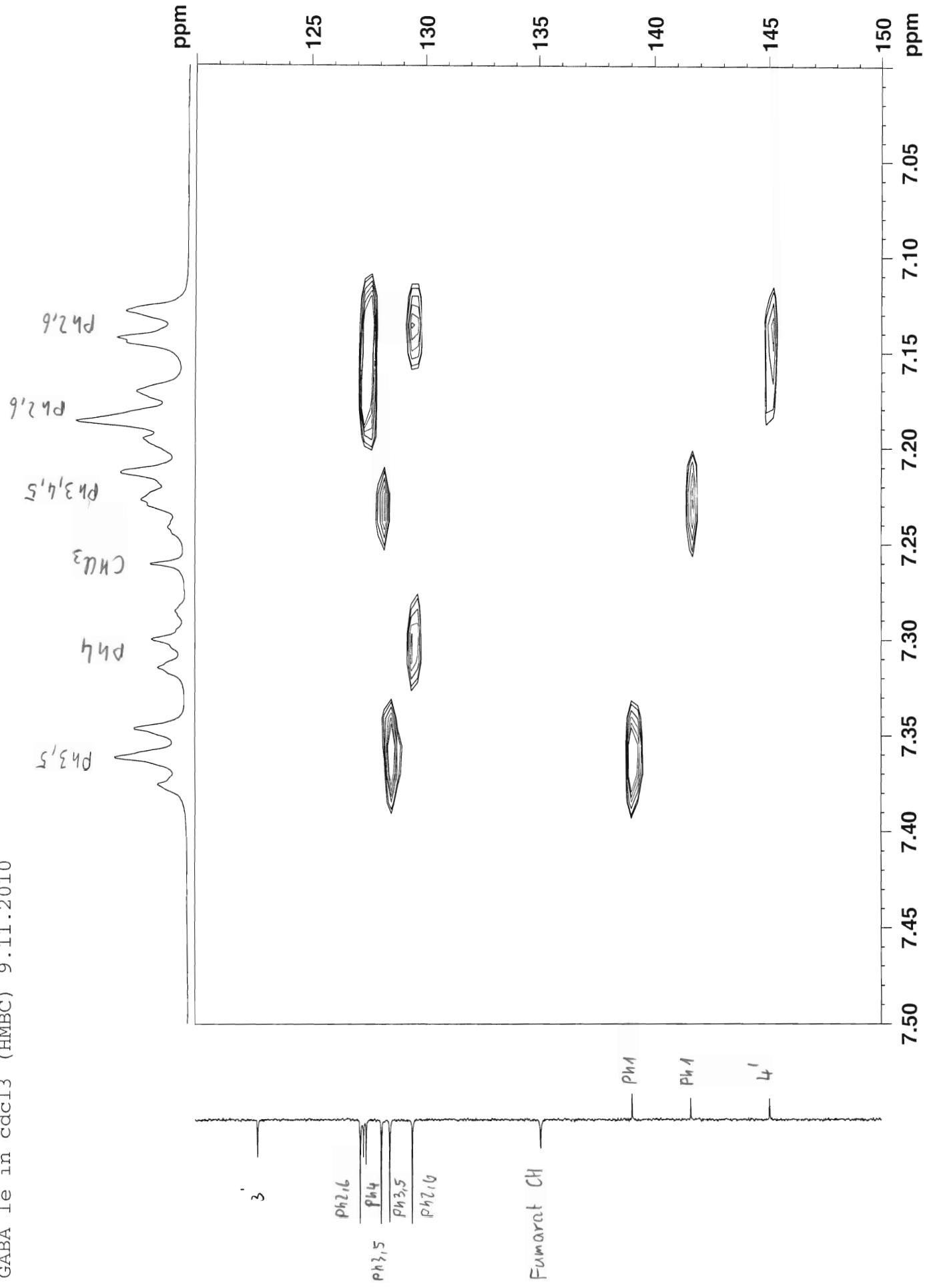
OMe

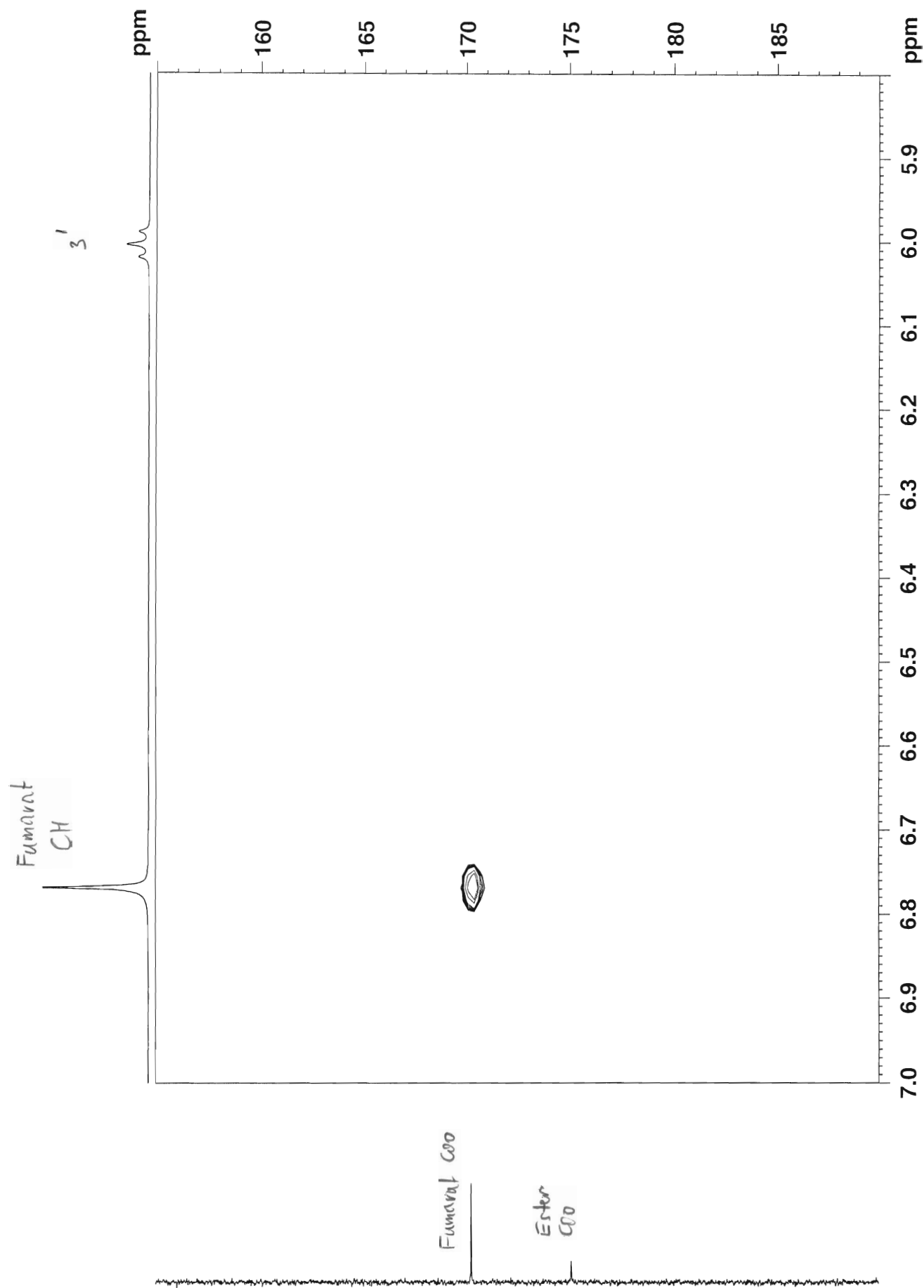


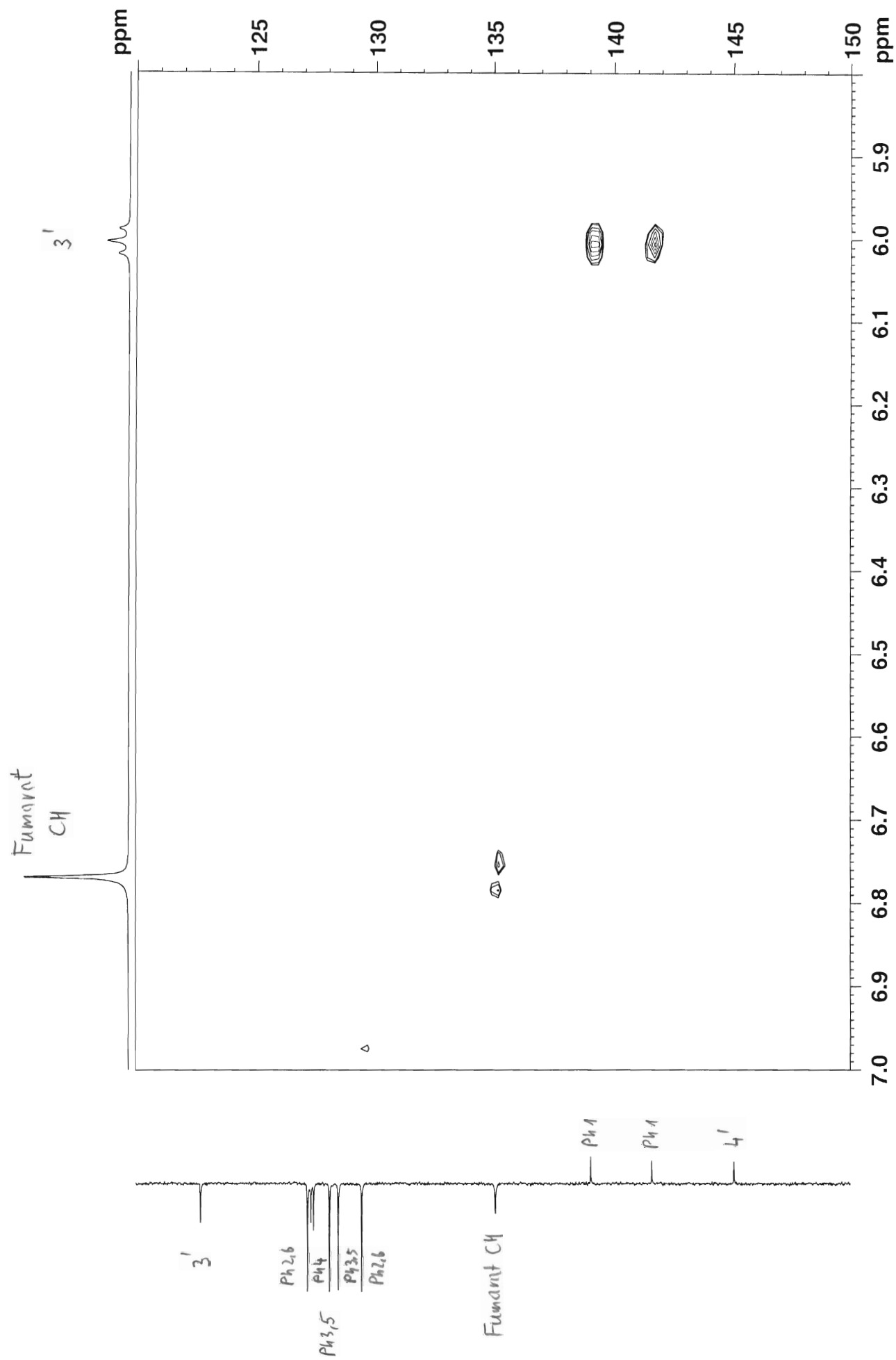


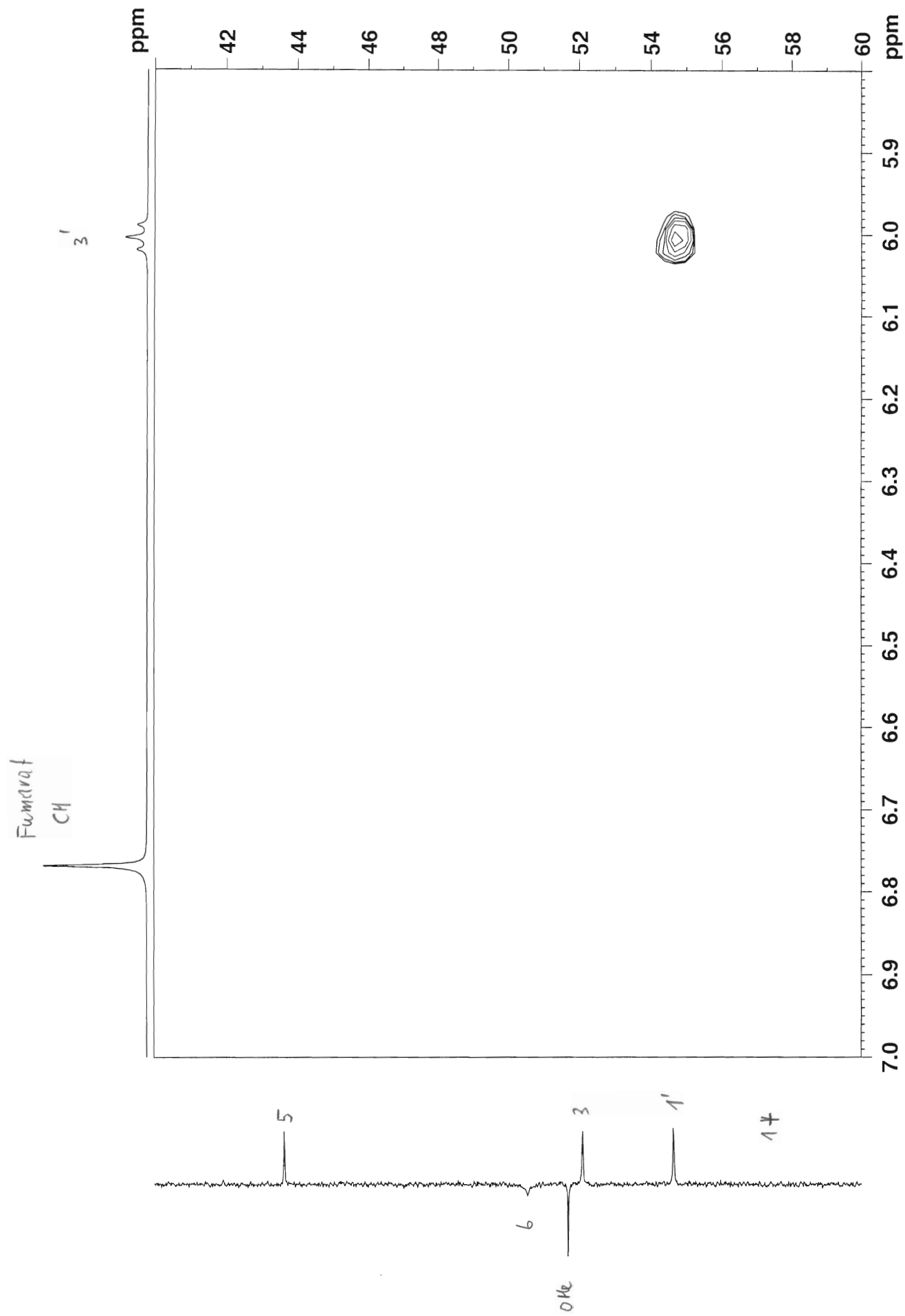
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



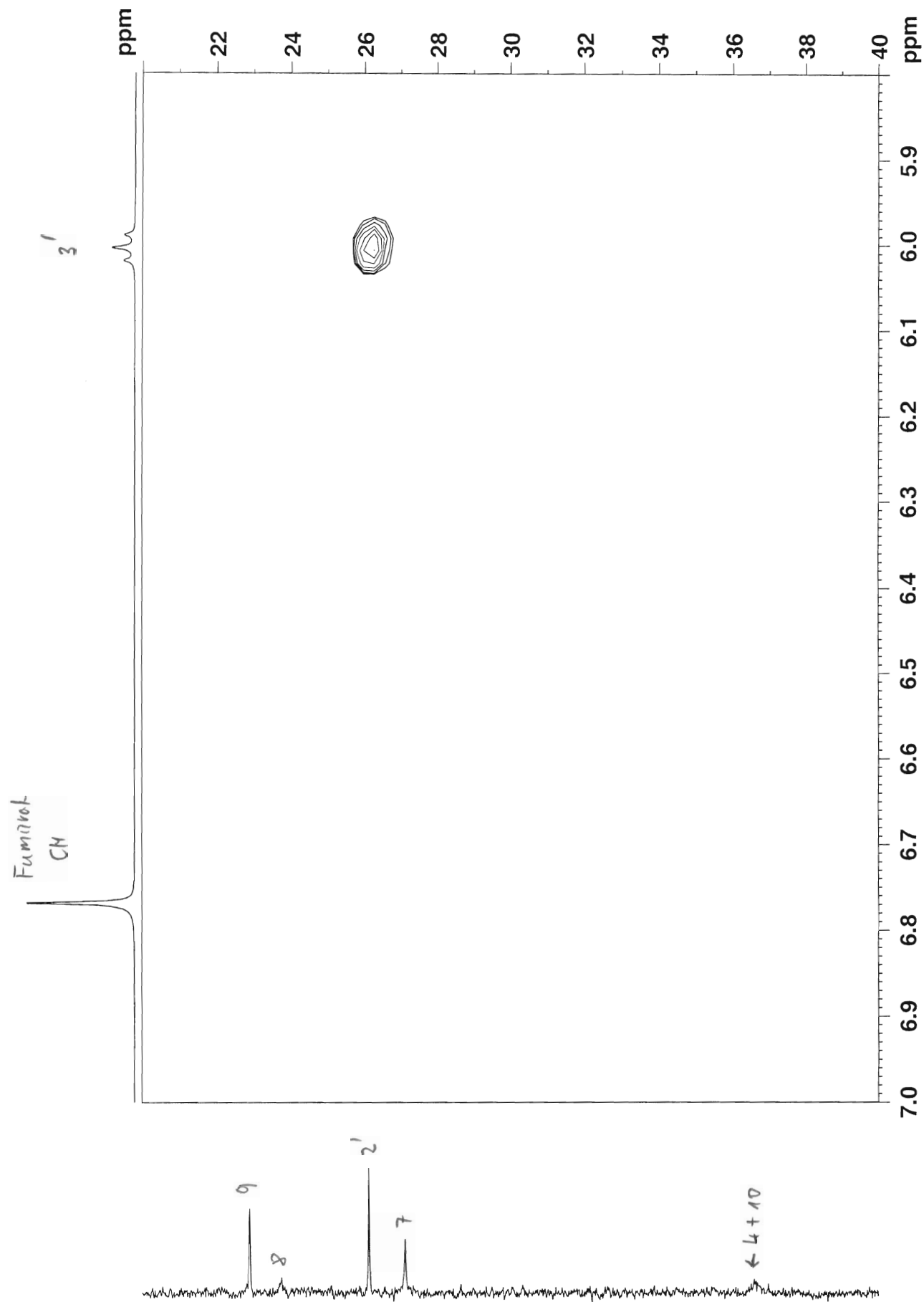




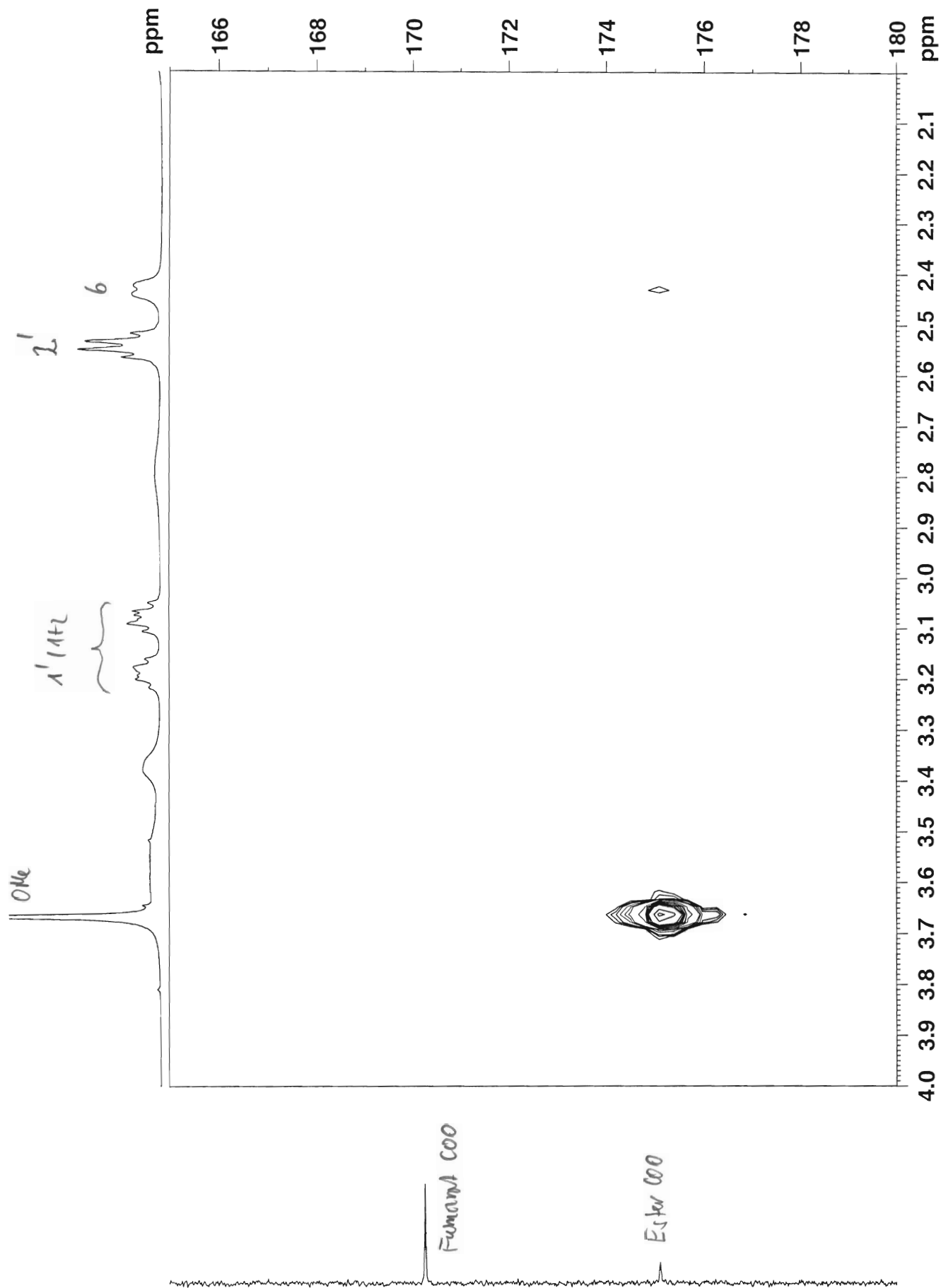




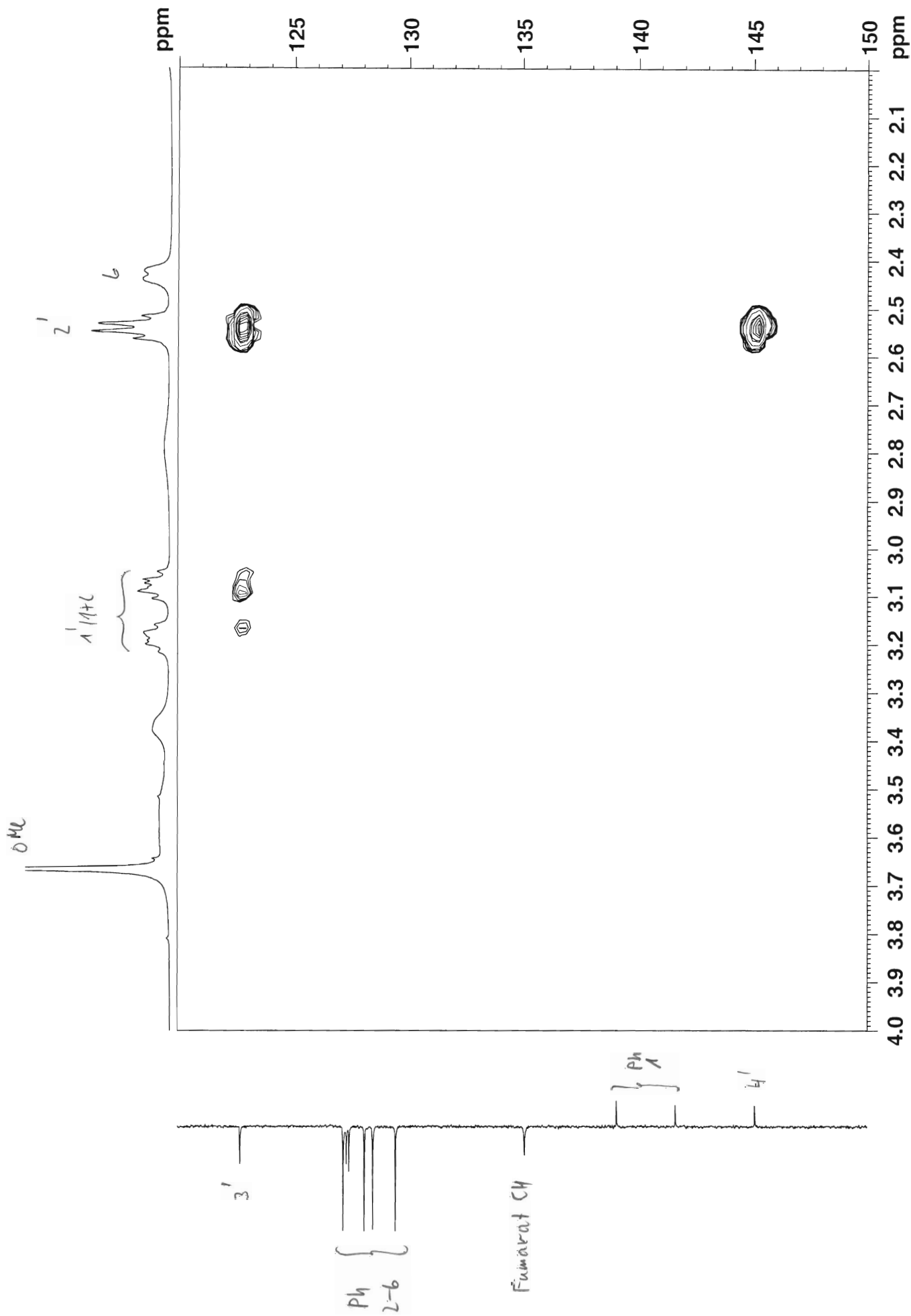
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



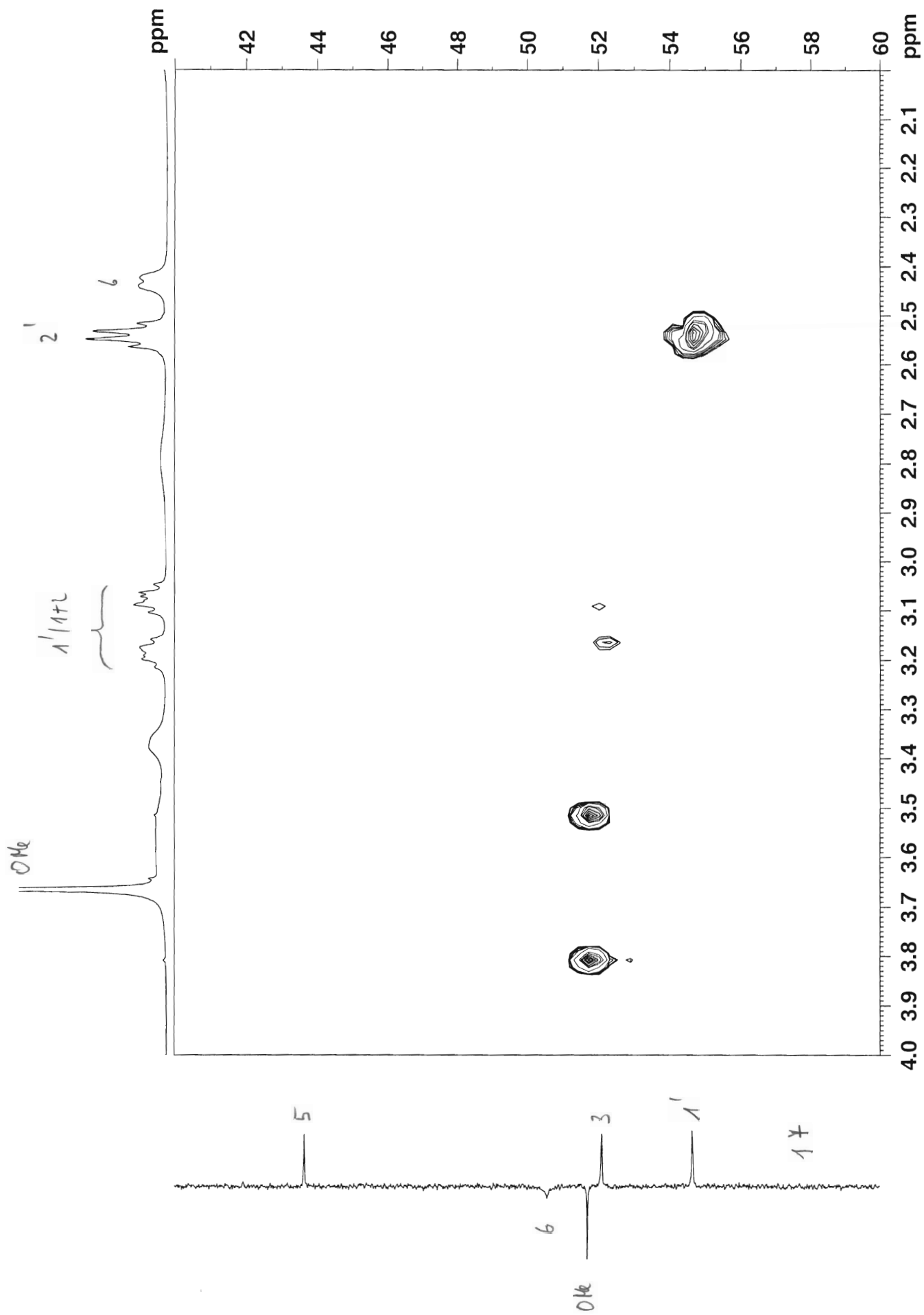
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



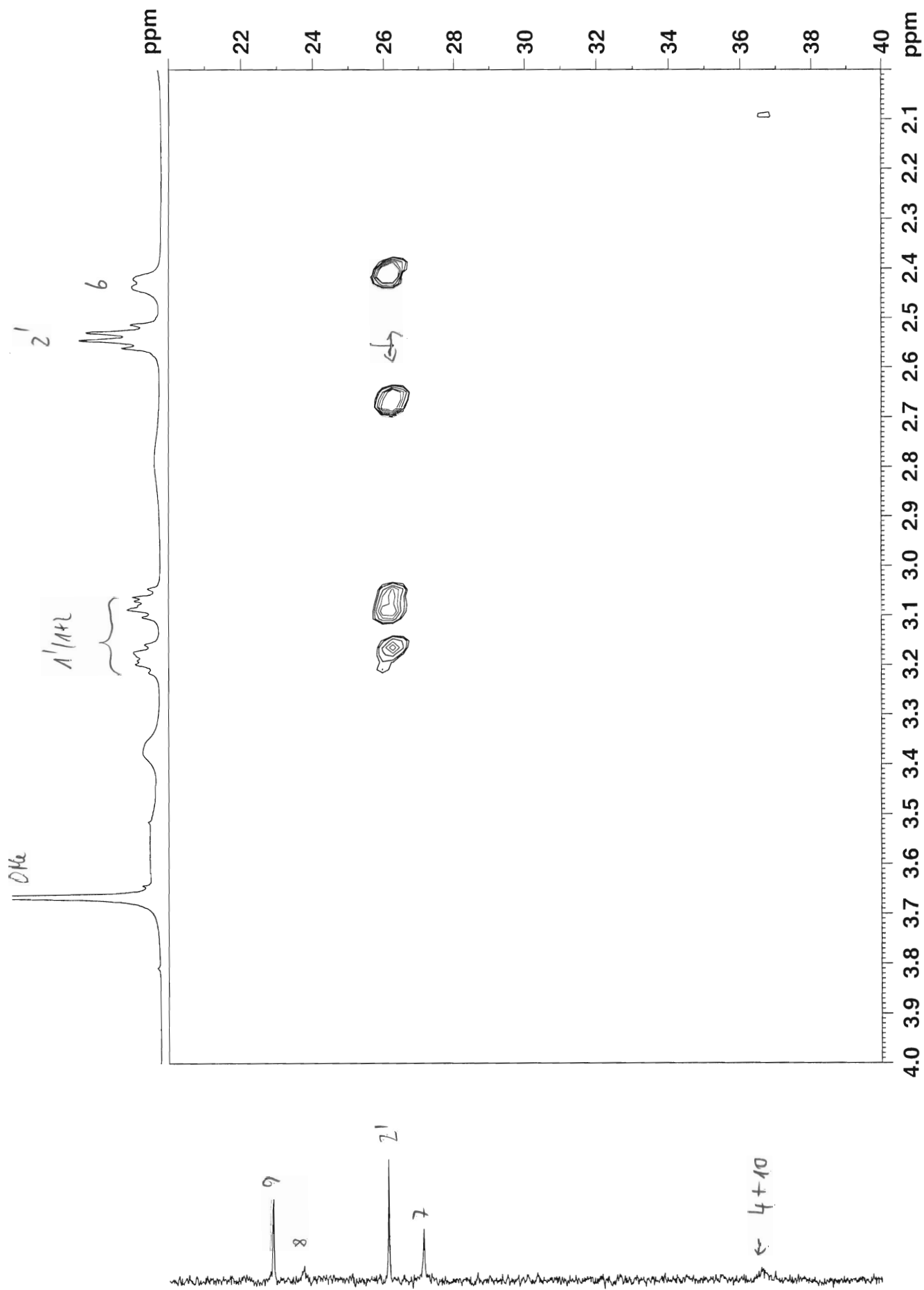
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



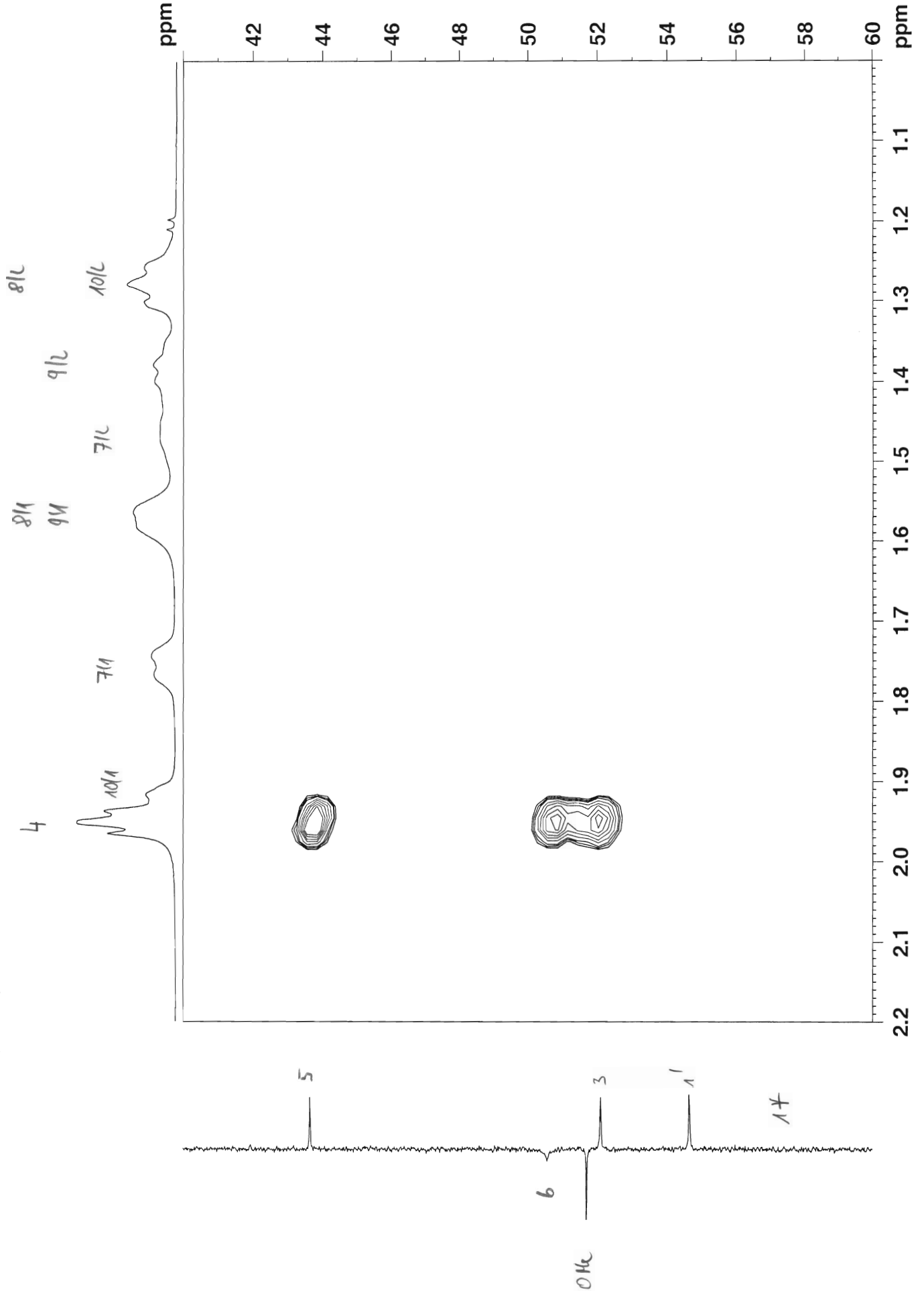
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



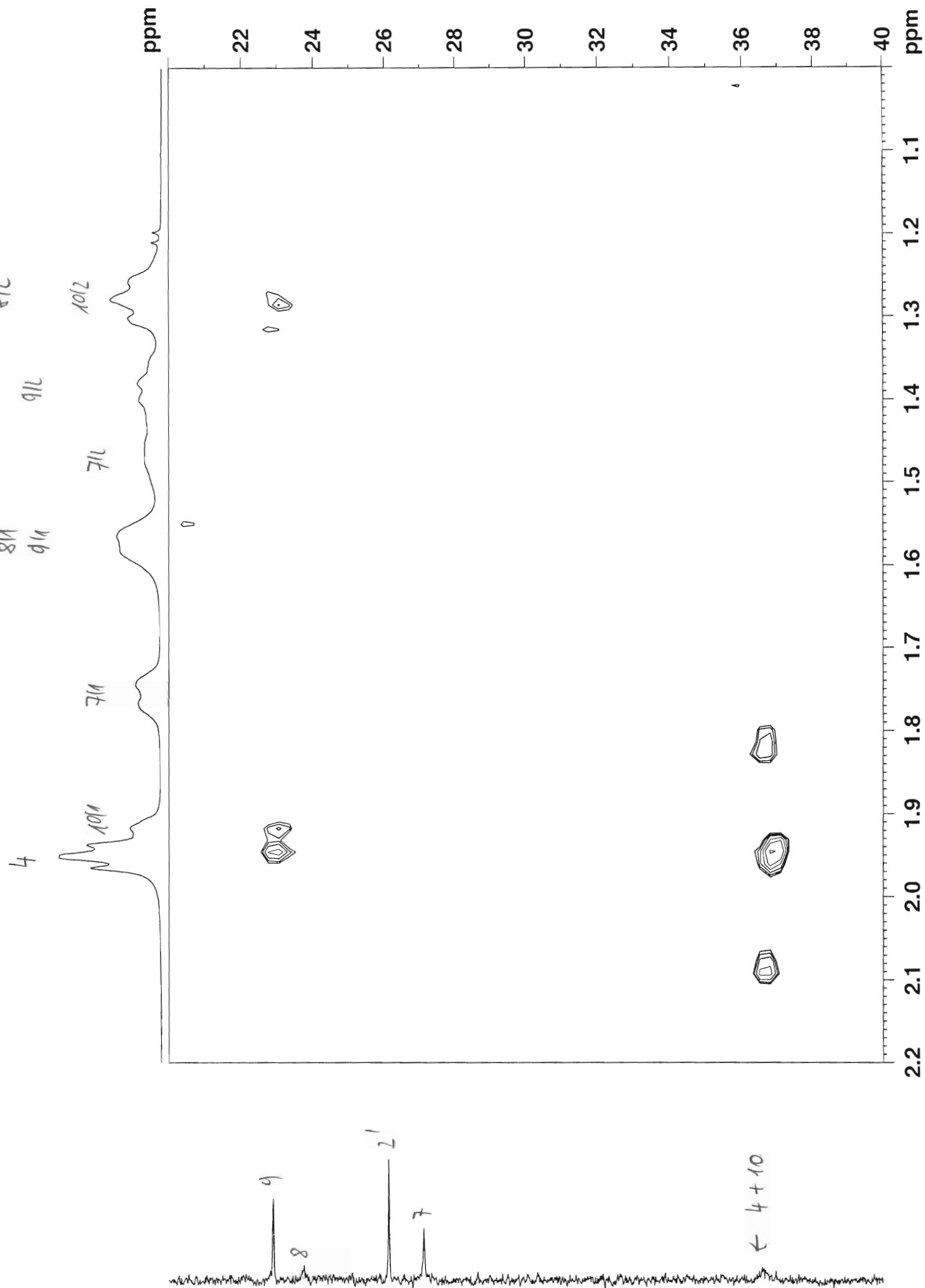
GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

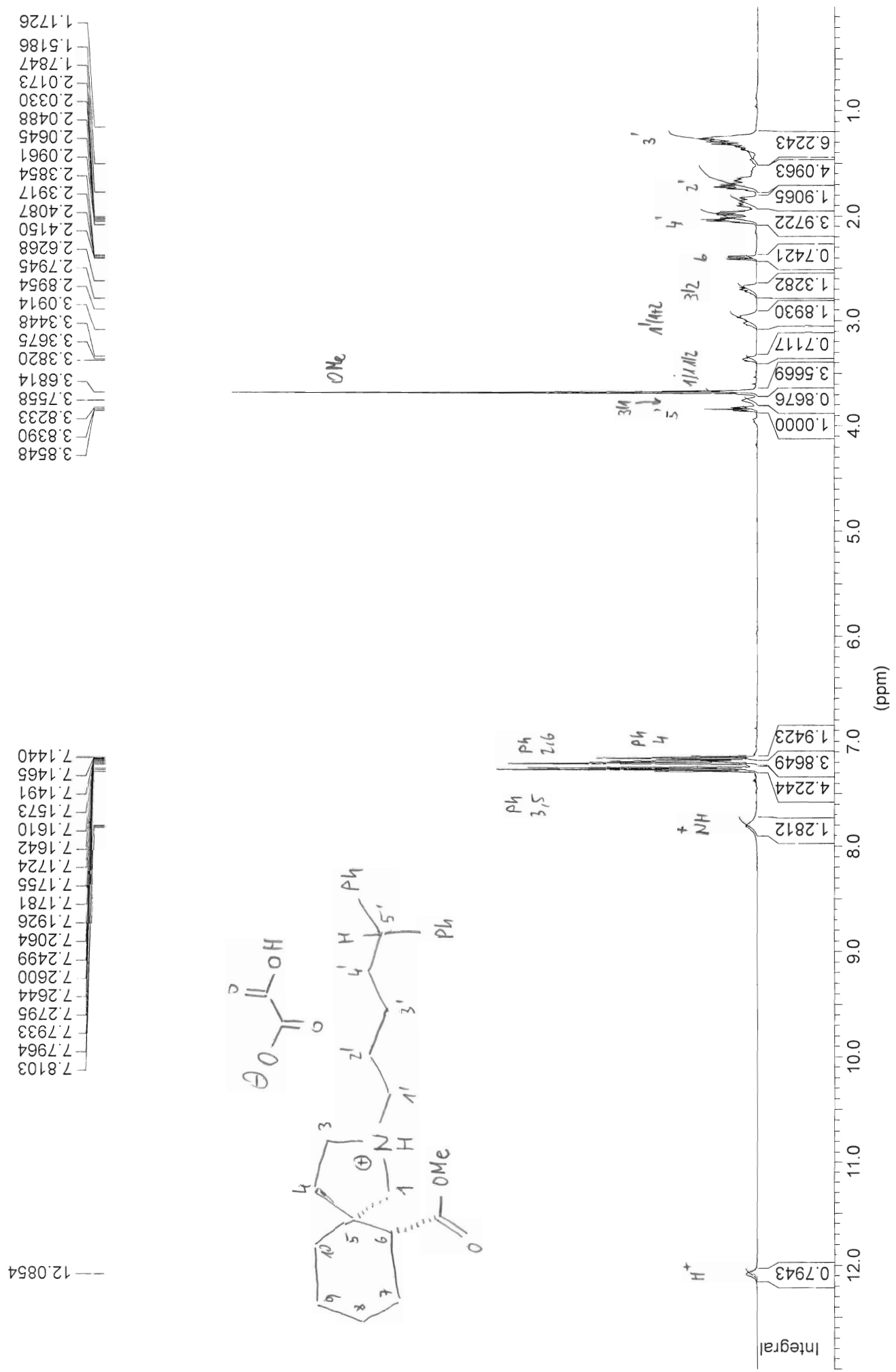


GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



GABA 1e in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

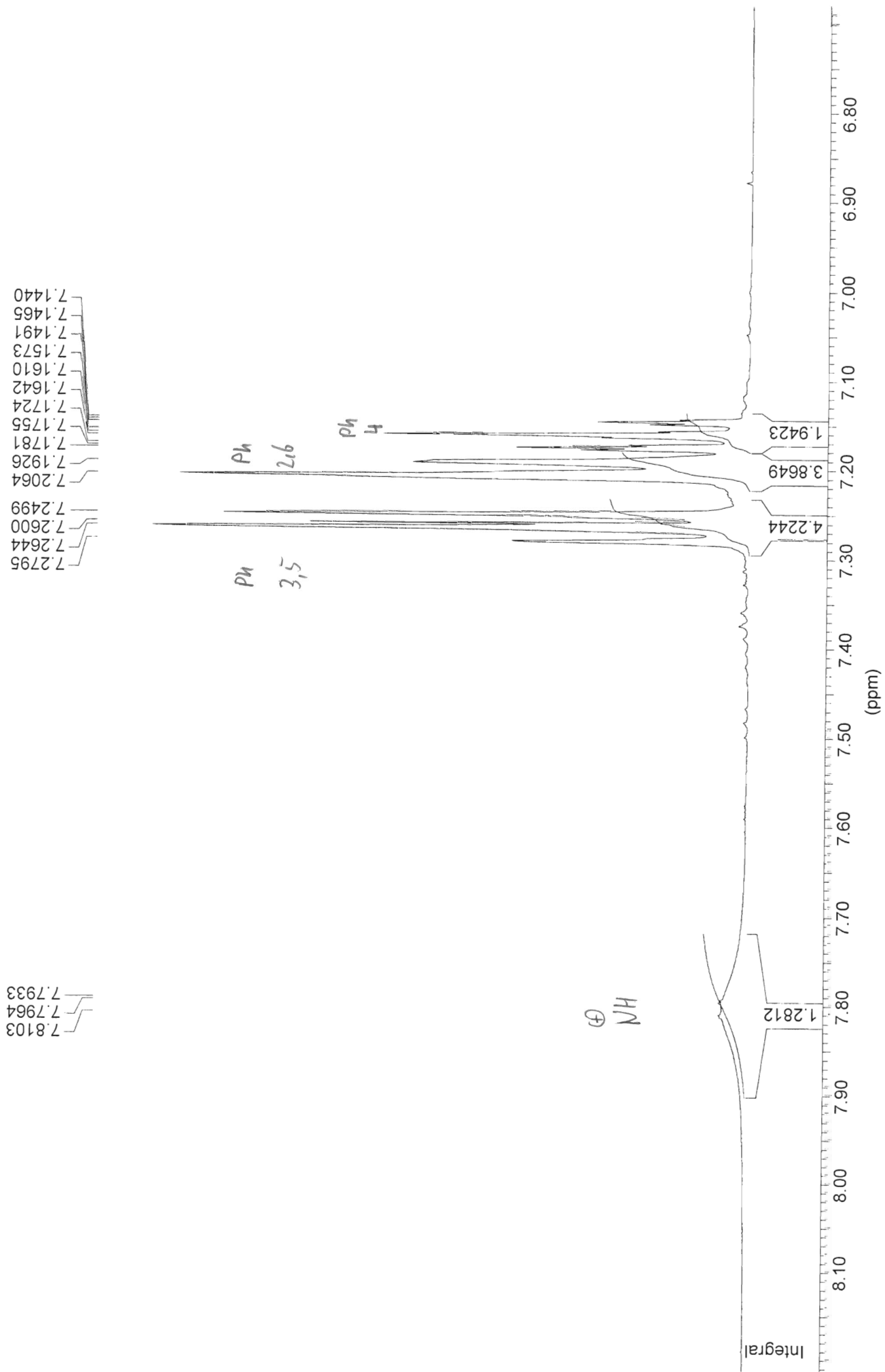


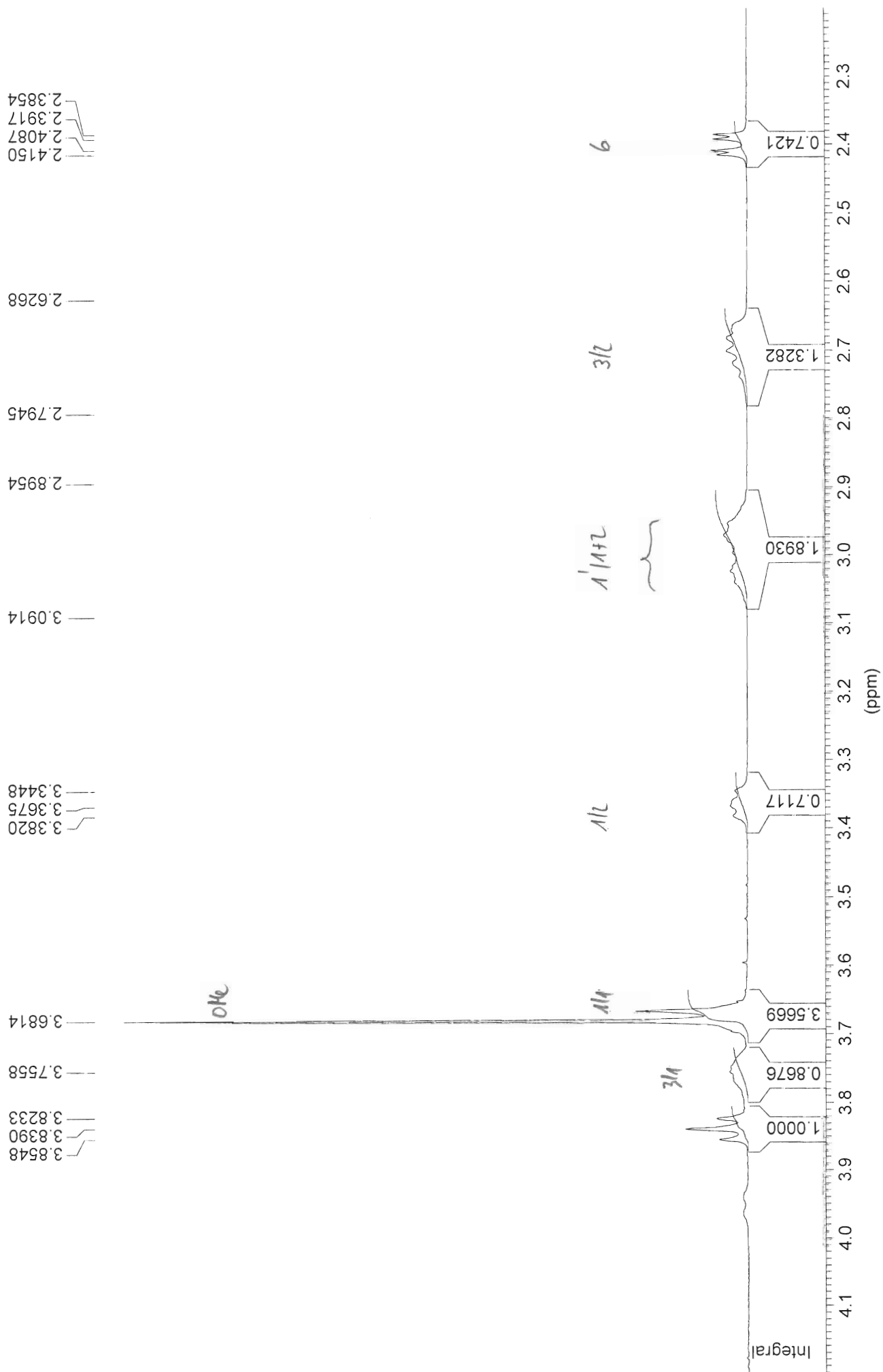


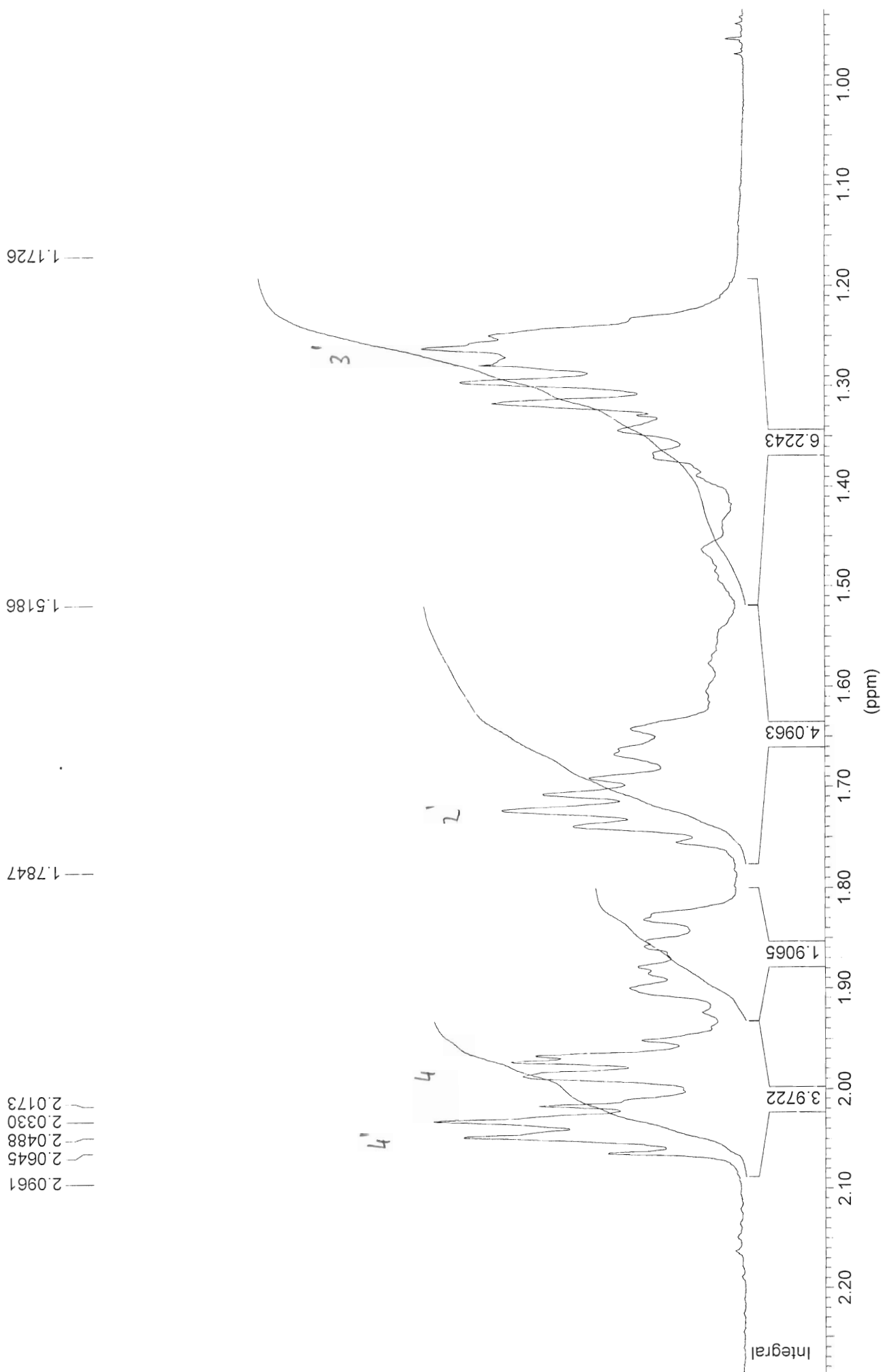
1.1726
1.5186
1.7847
2.0173
2.0330
2.0488
2.0645
2.0961
2.3854
2.3917
2.4087
2.4150
2.6268
2.7945
2.8954
3.0914
3.3448
3.3675
3.3820
3.6814
3.7558
3.8233
3.8390
3.8548

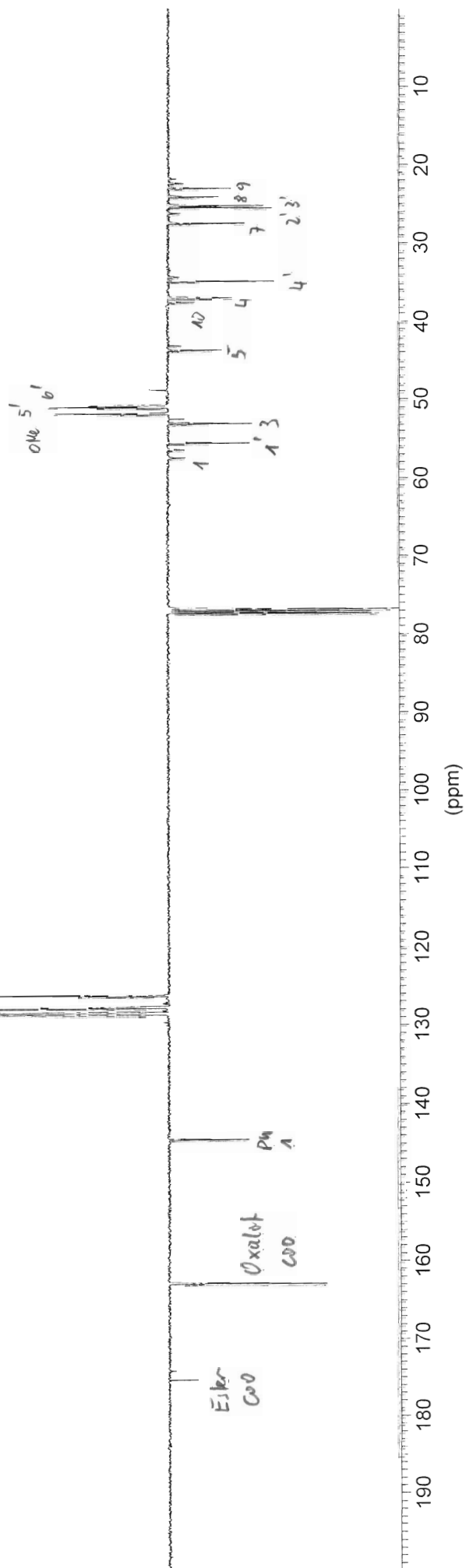
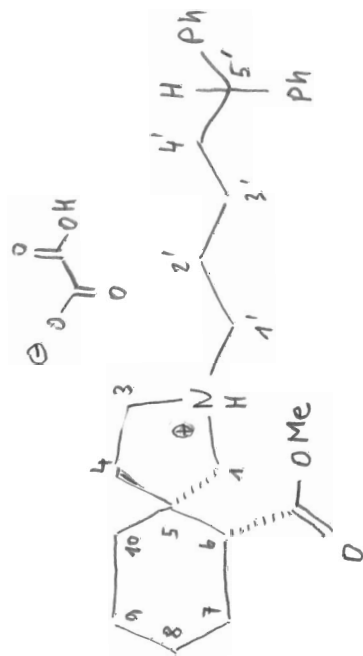
7.1440
7.1465
7.1491
7.1573
7.1610
7.1642
7.1724
7.1755
7.1781
7.1926
7.2064
7.2499
7.2600
7.2644
7.2795
7.7933
7.7964
7.8103

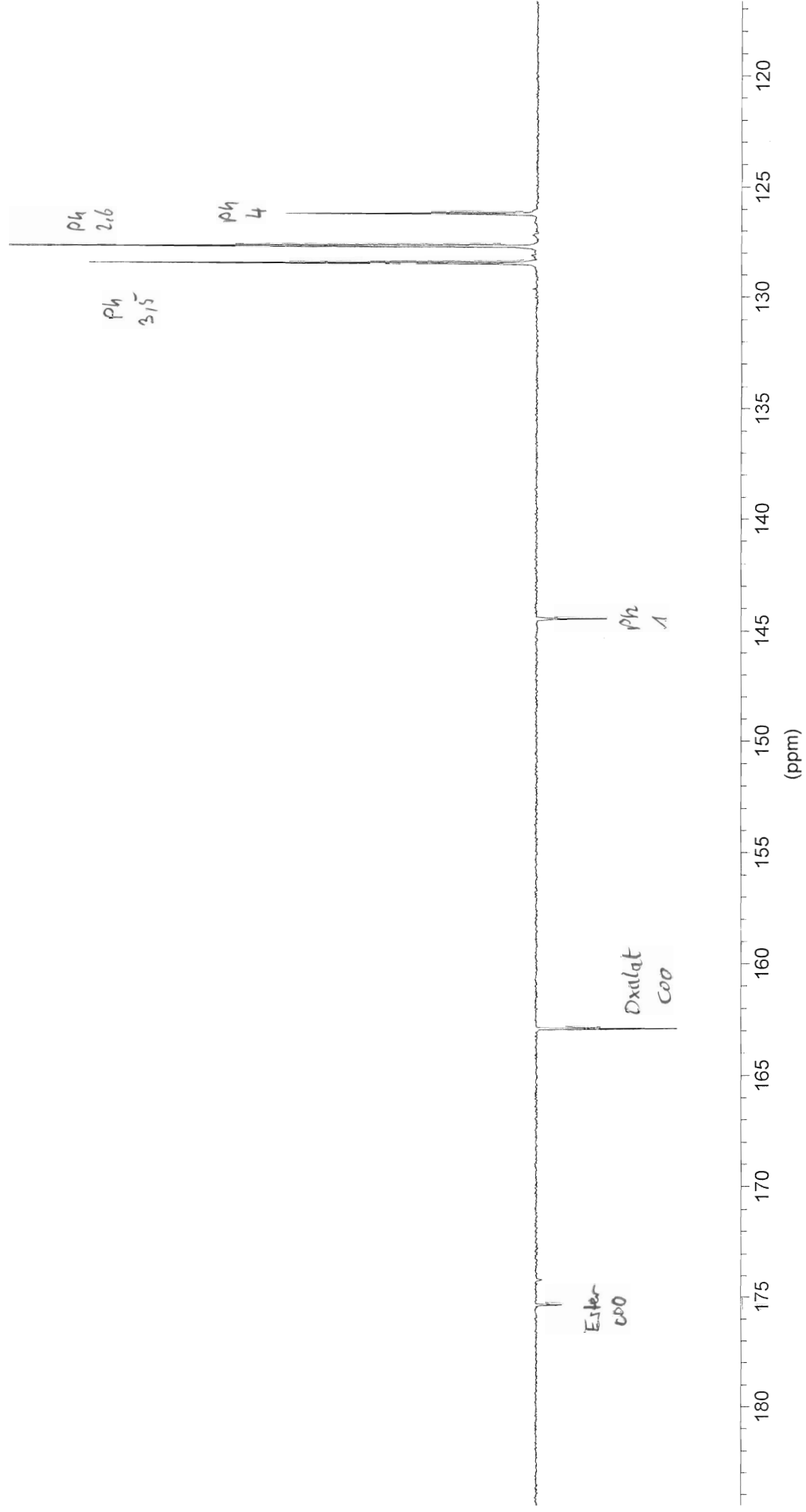
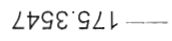
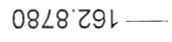
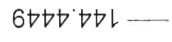
12.0854

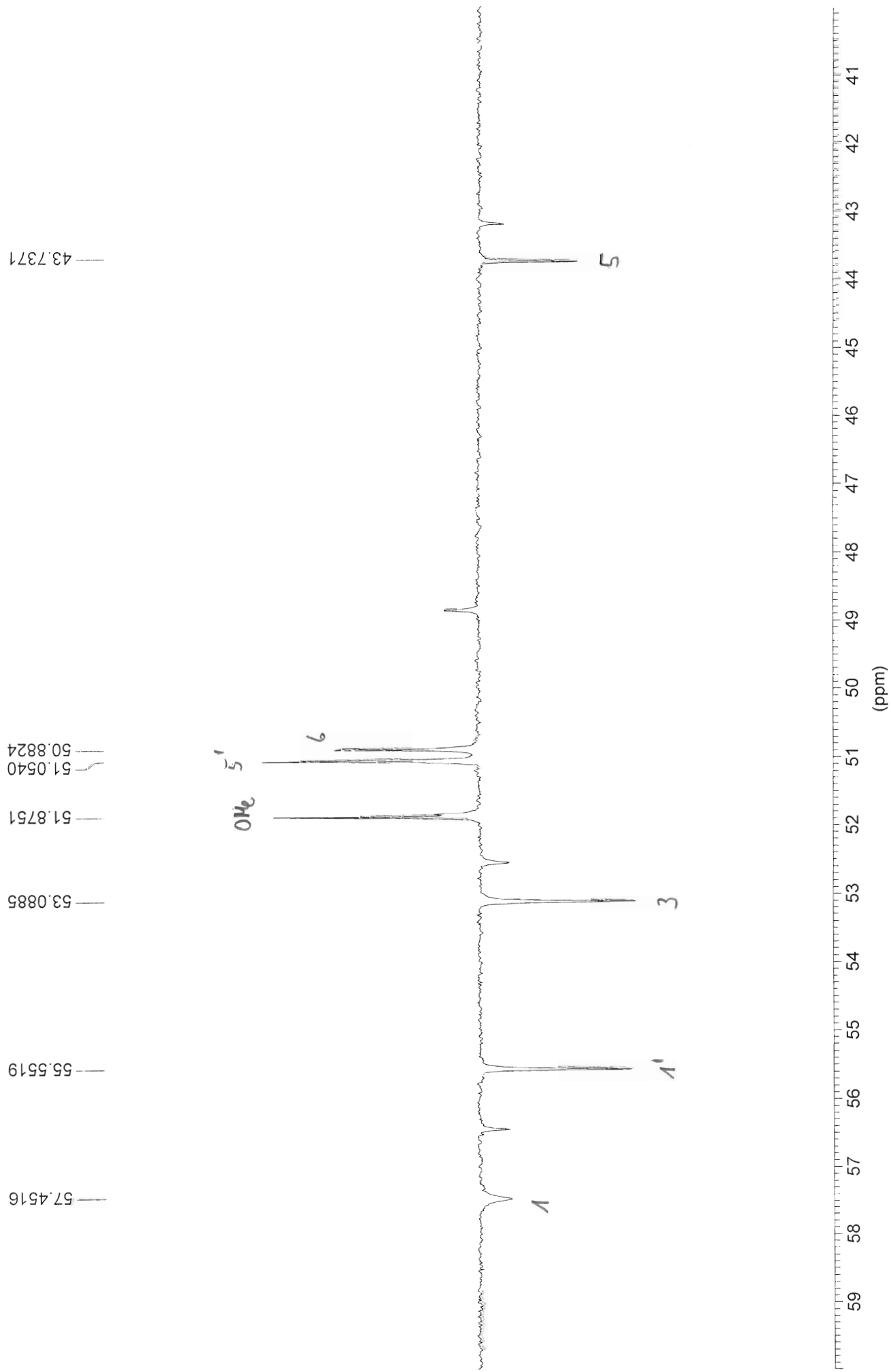


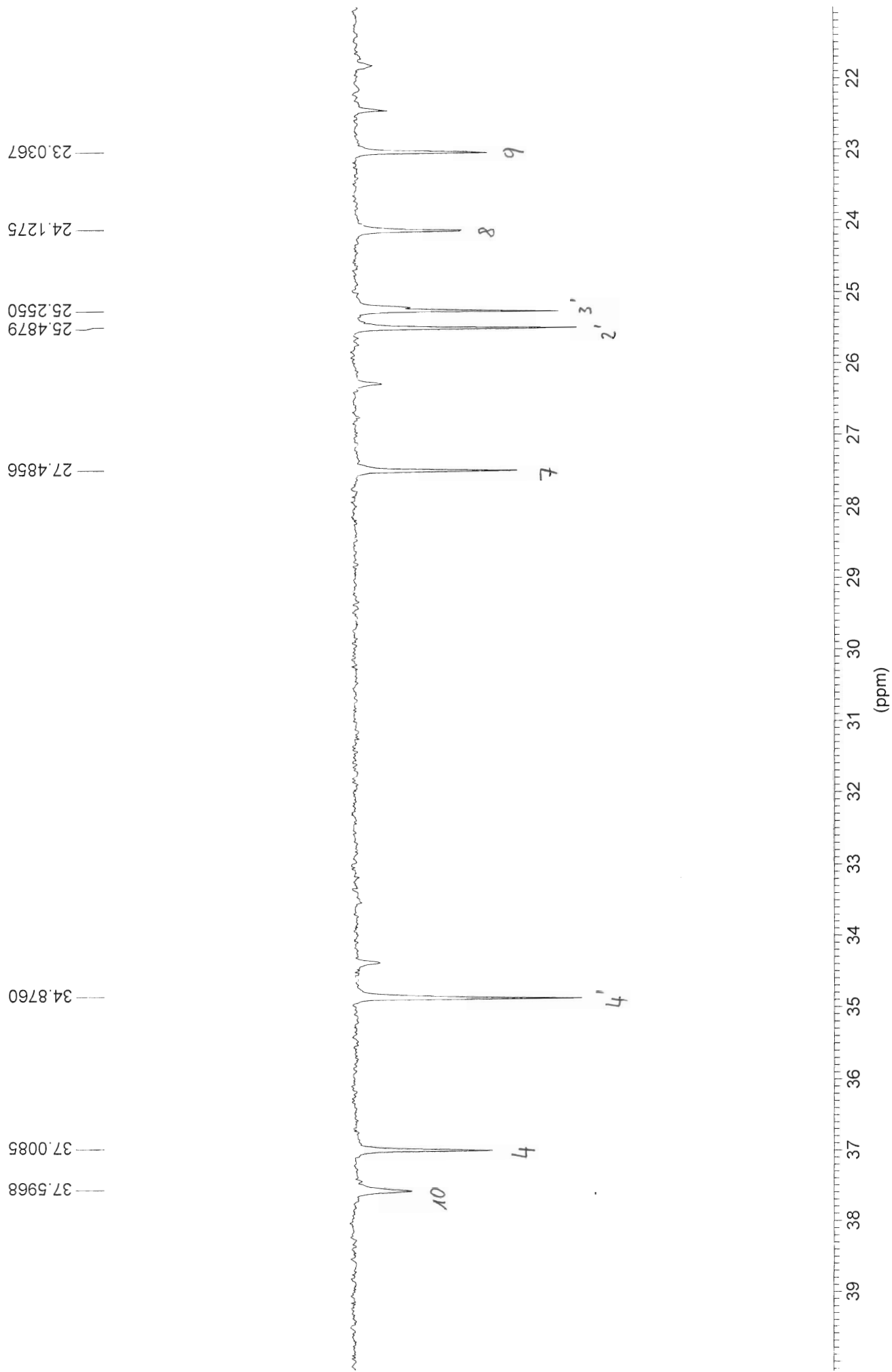




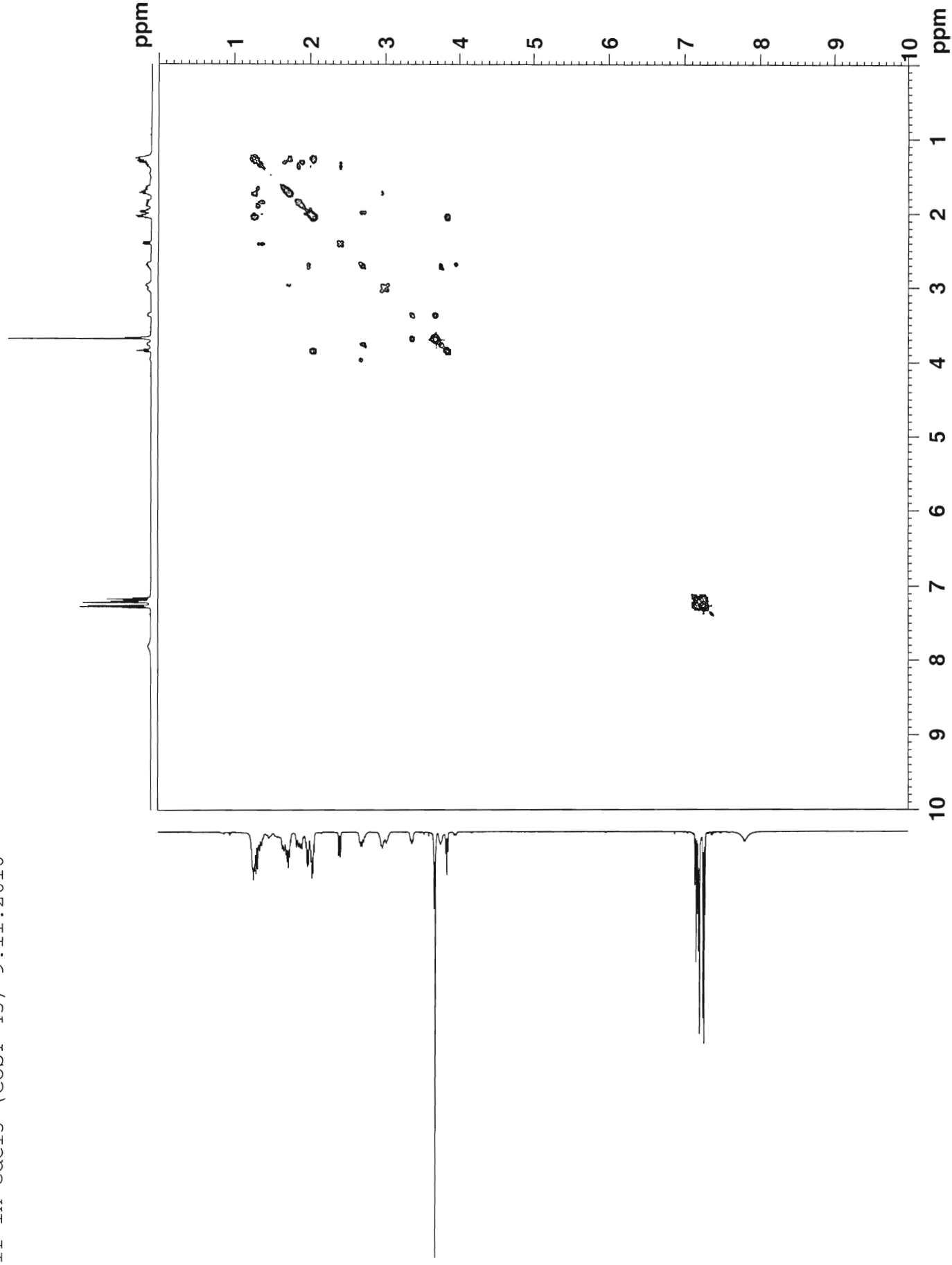


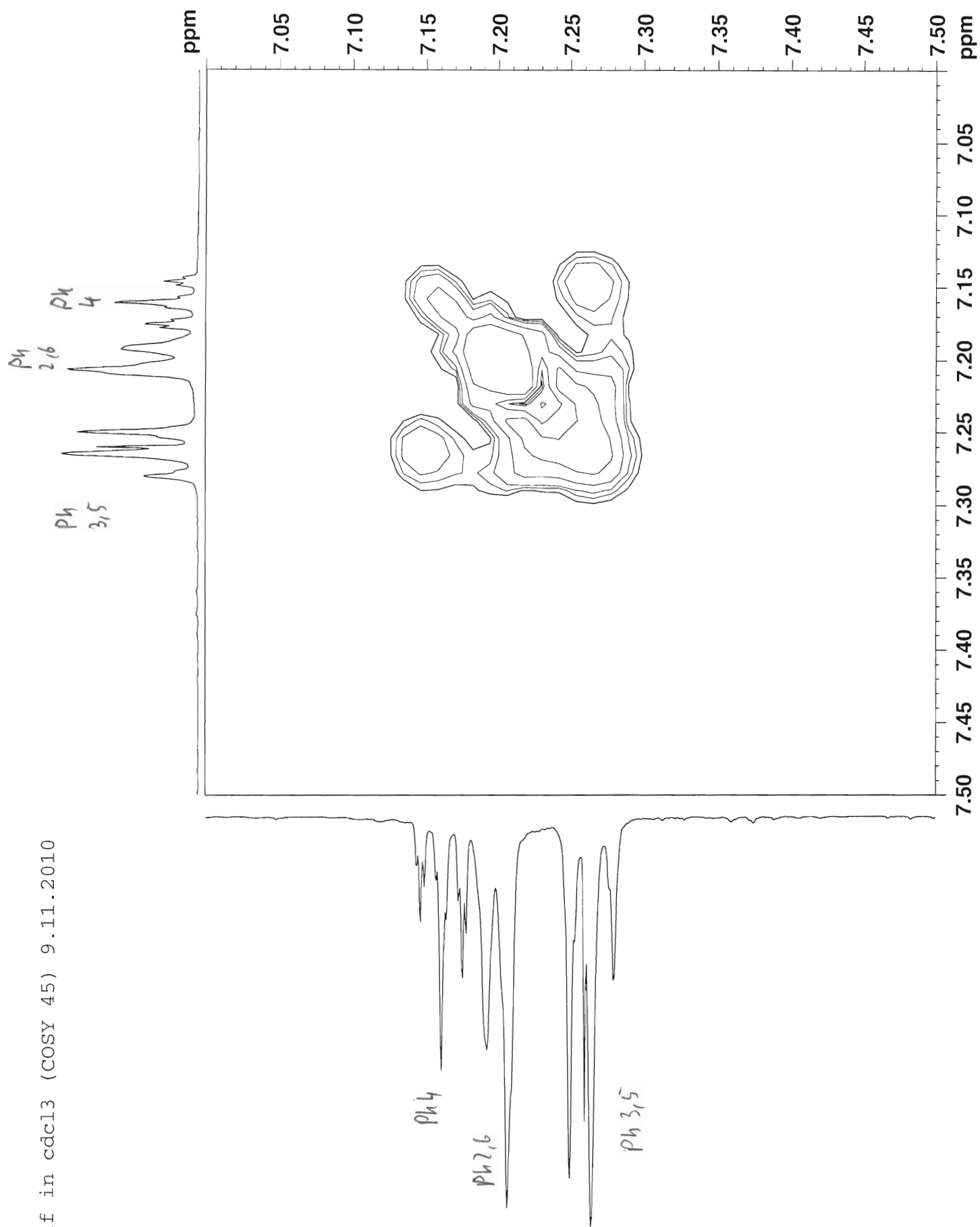


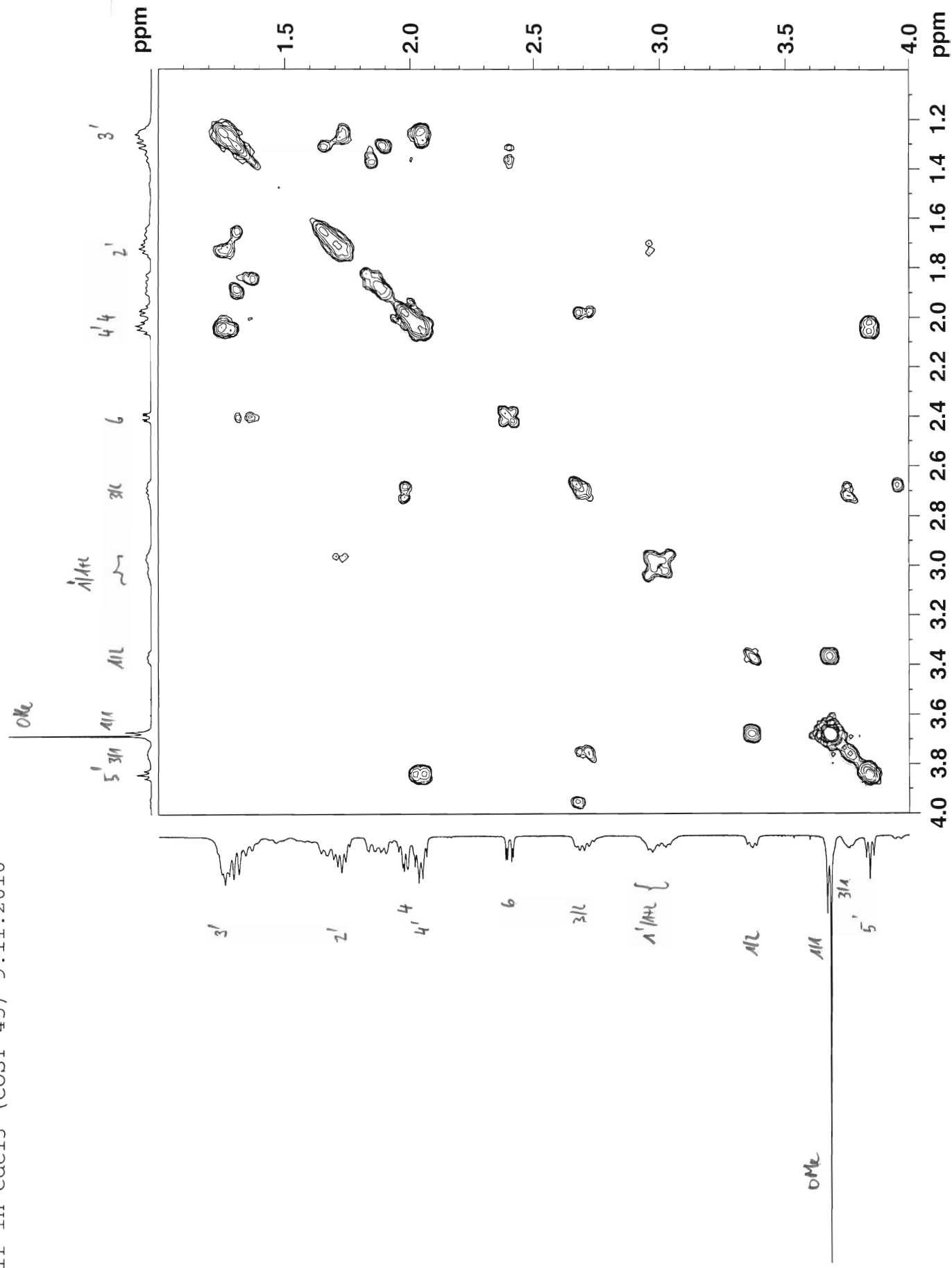


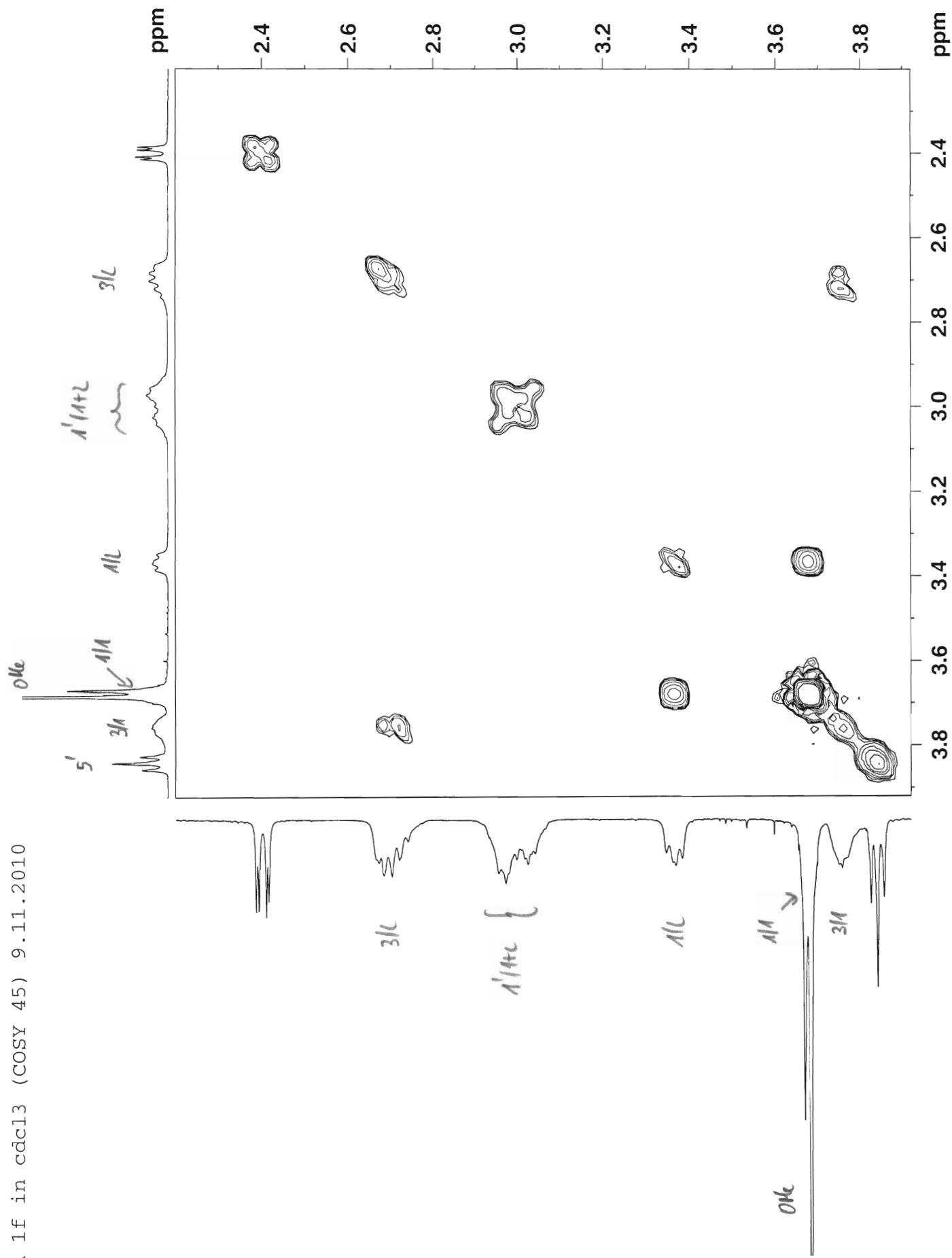


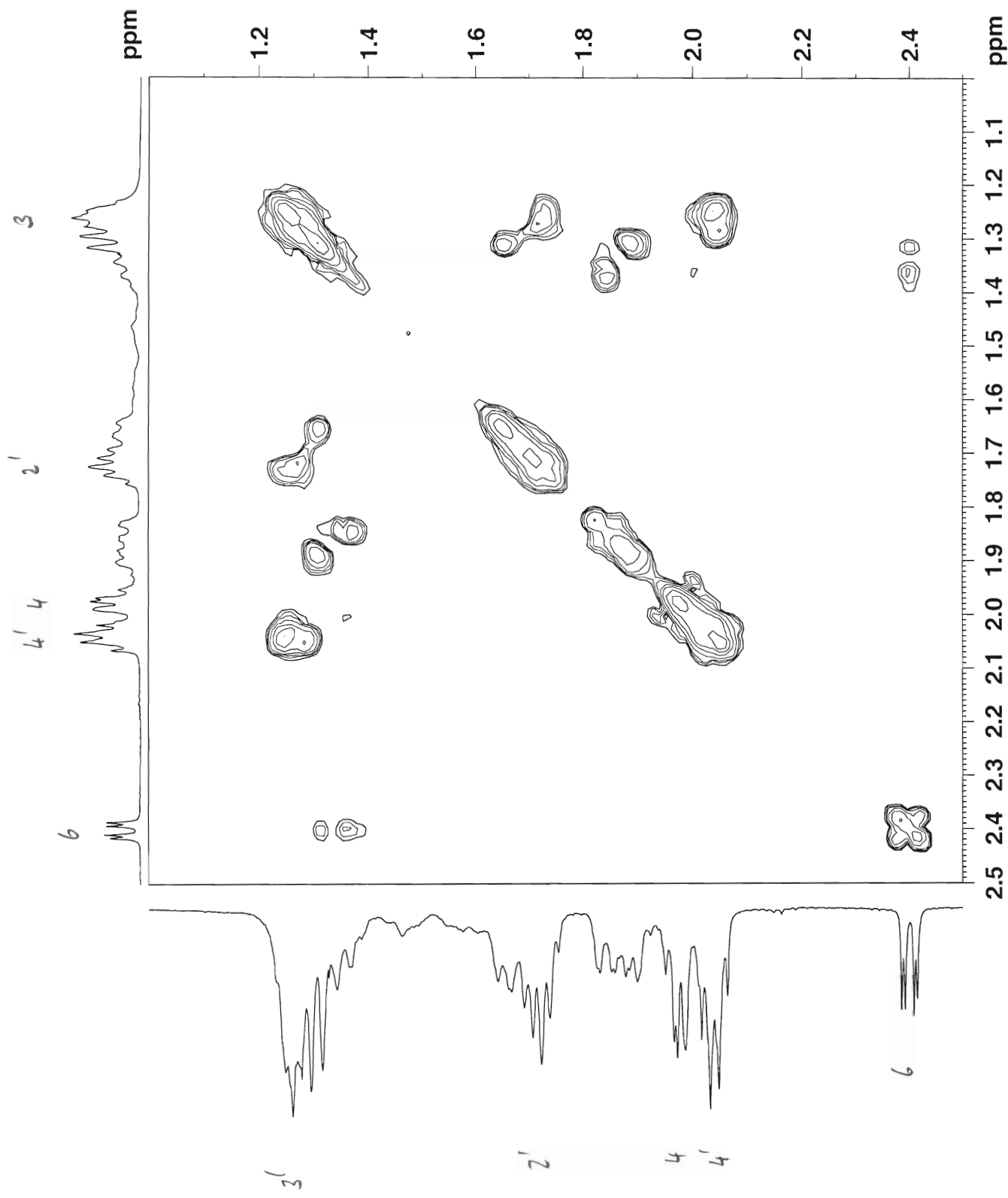
GABA 1f in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010



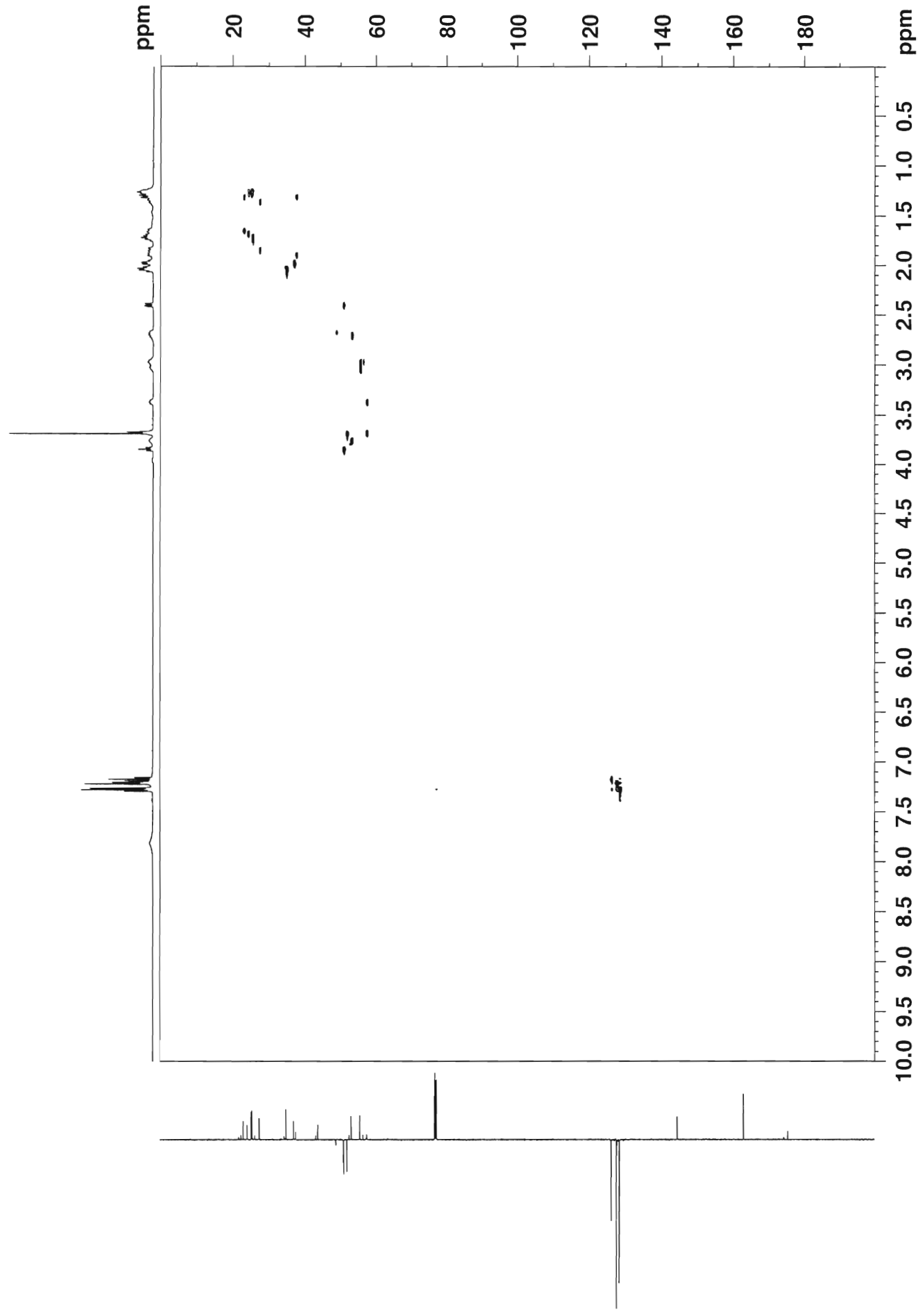


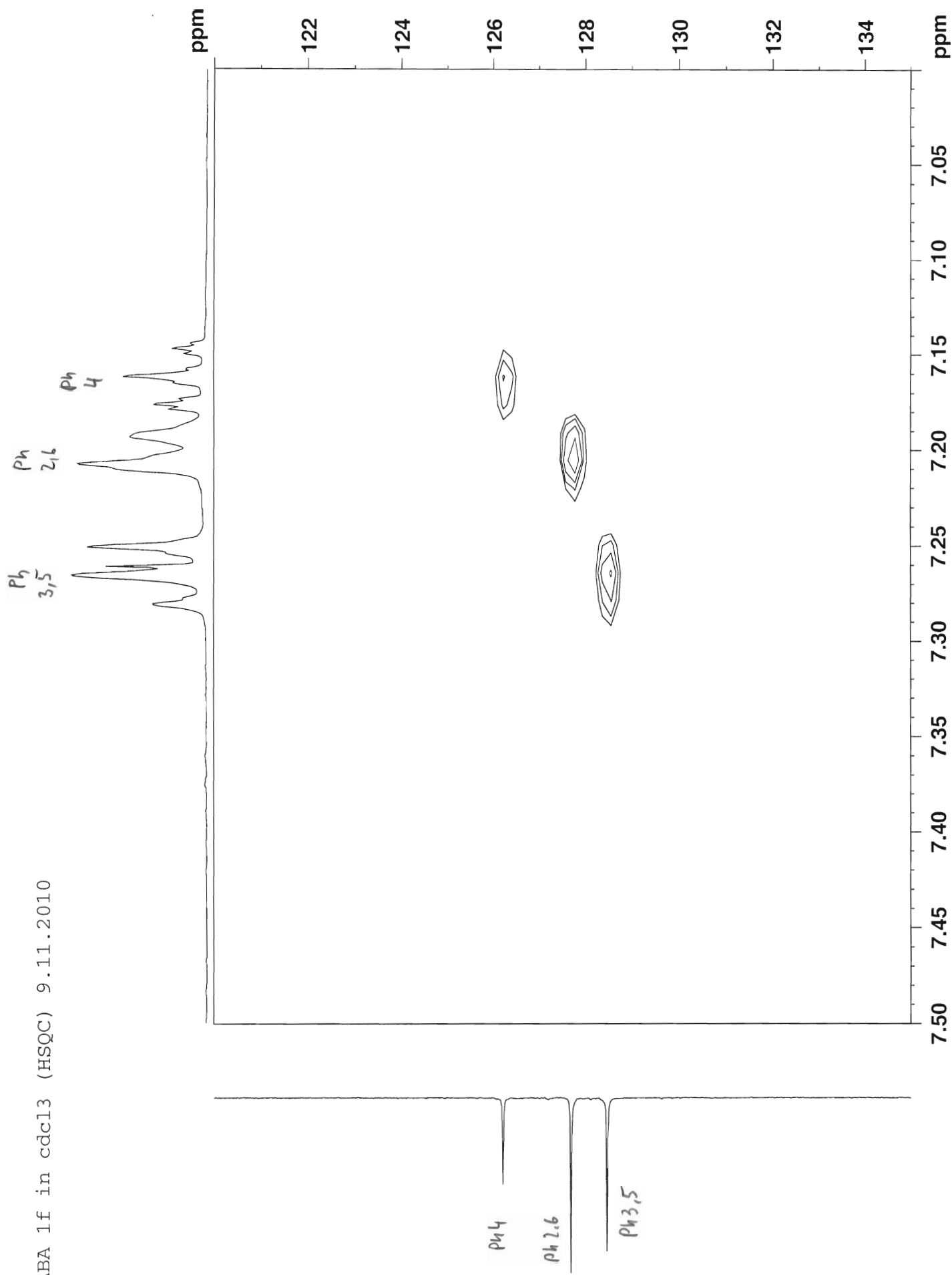


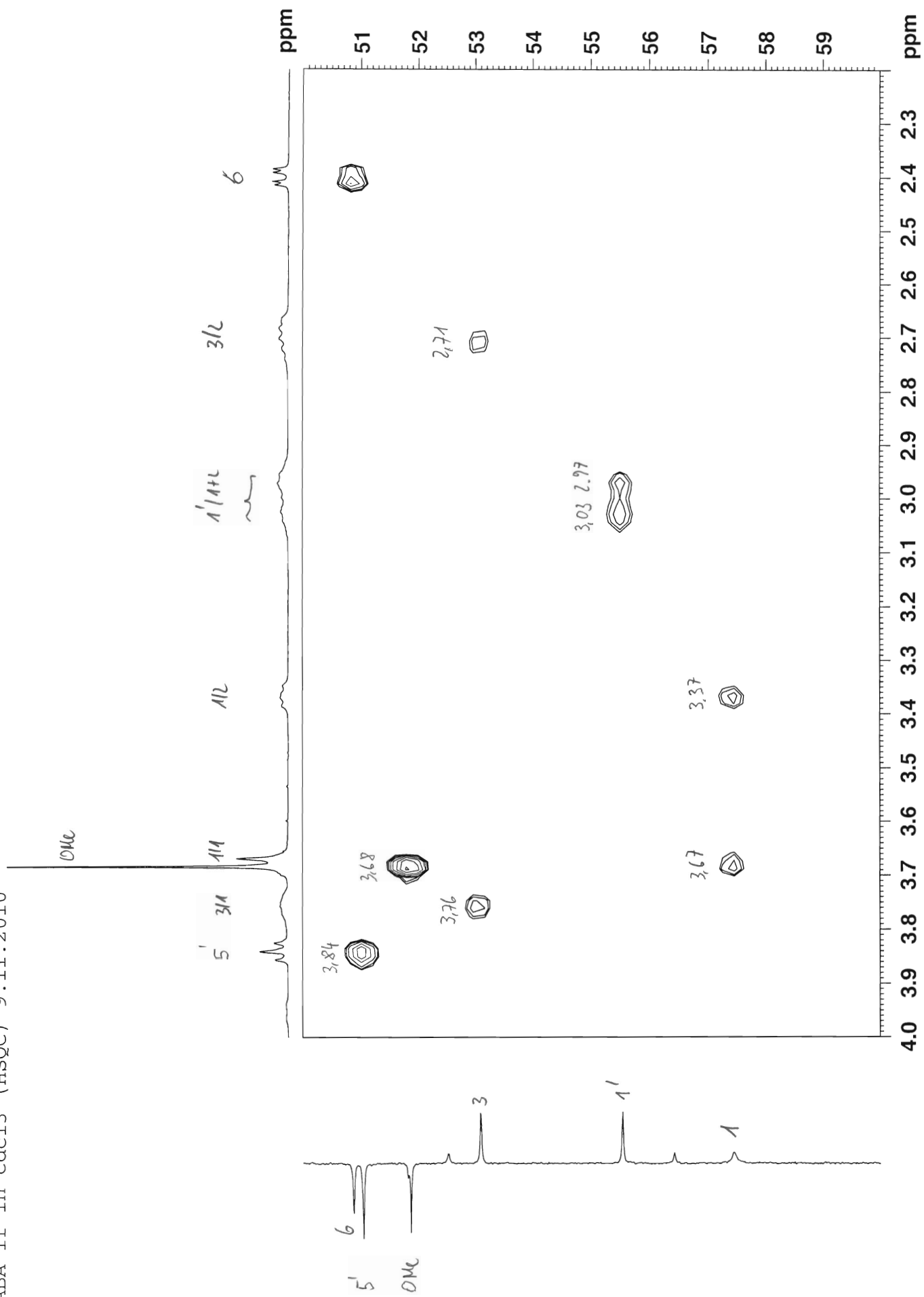




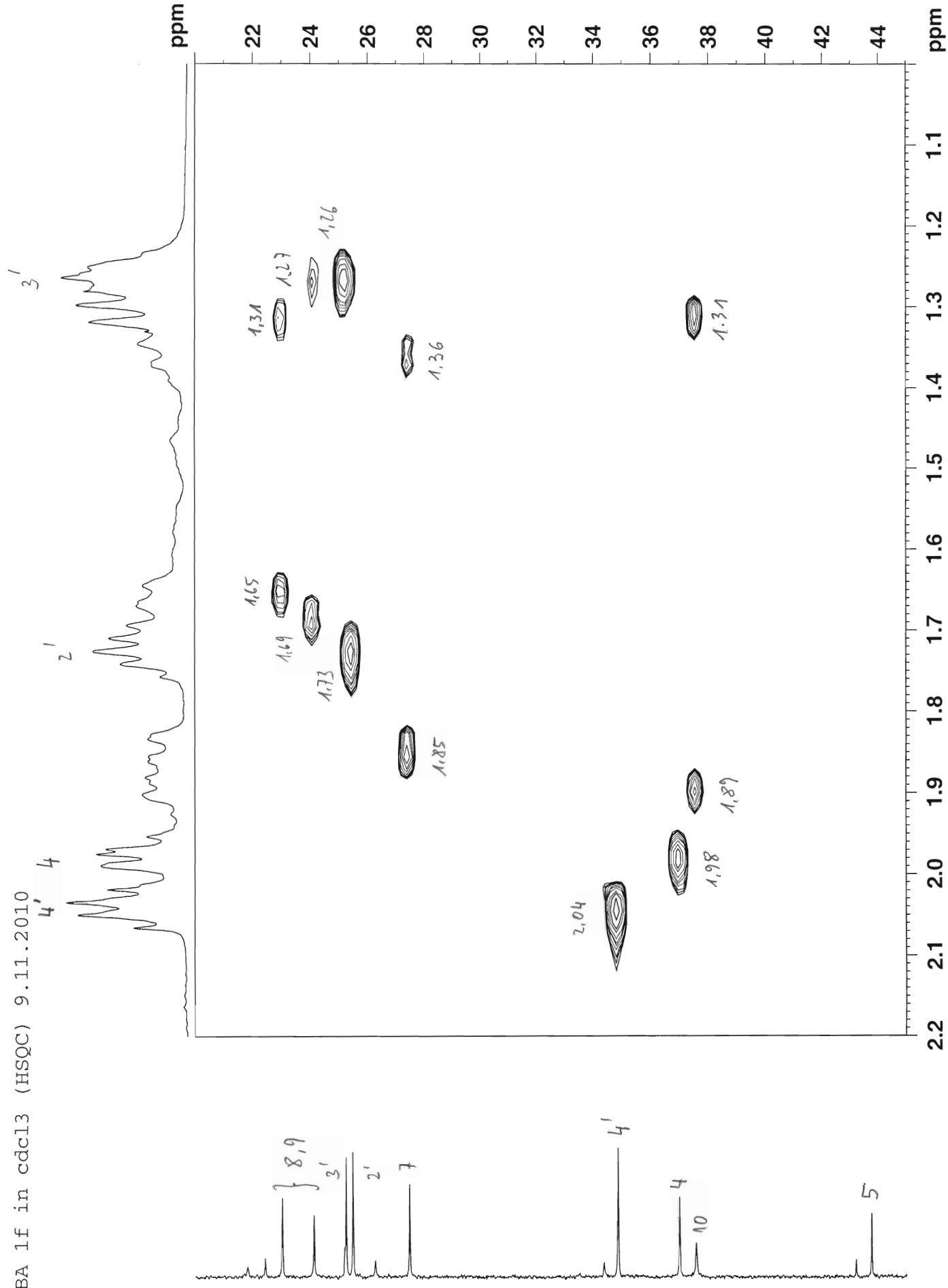
GABA 1f in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010

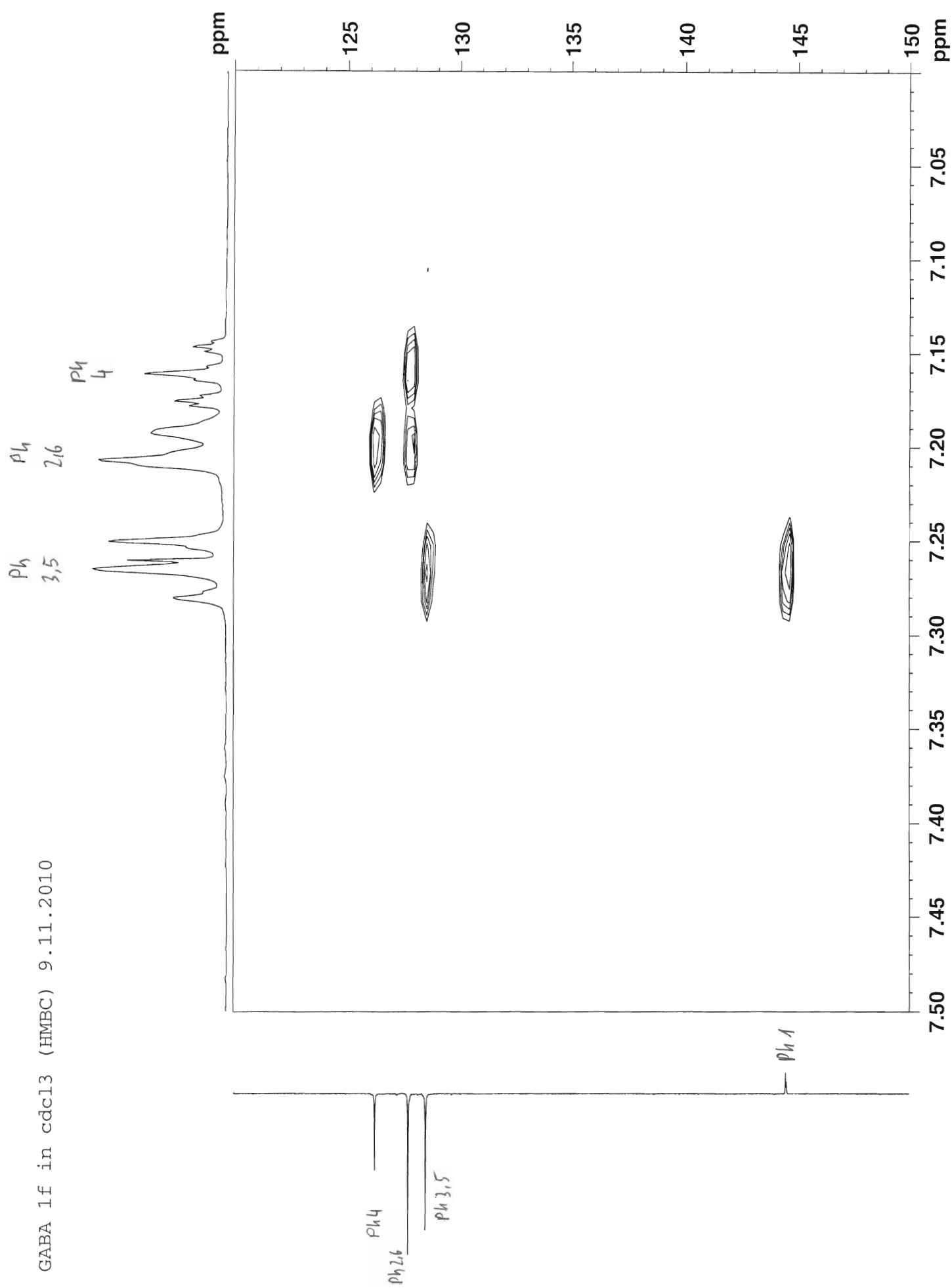


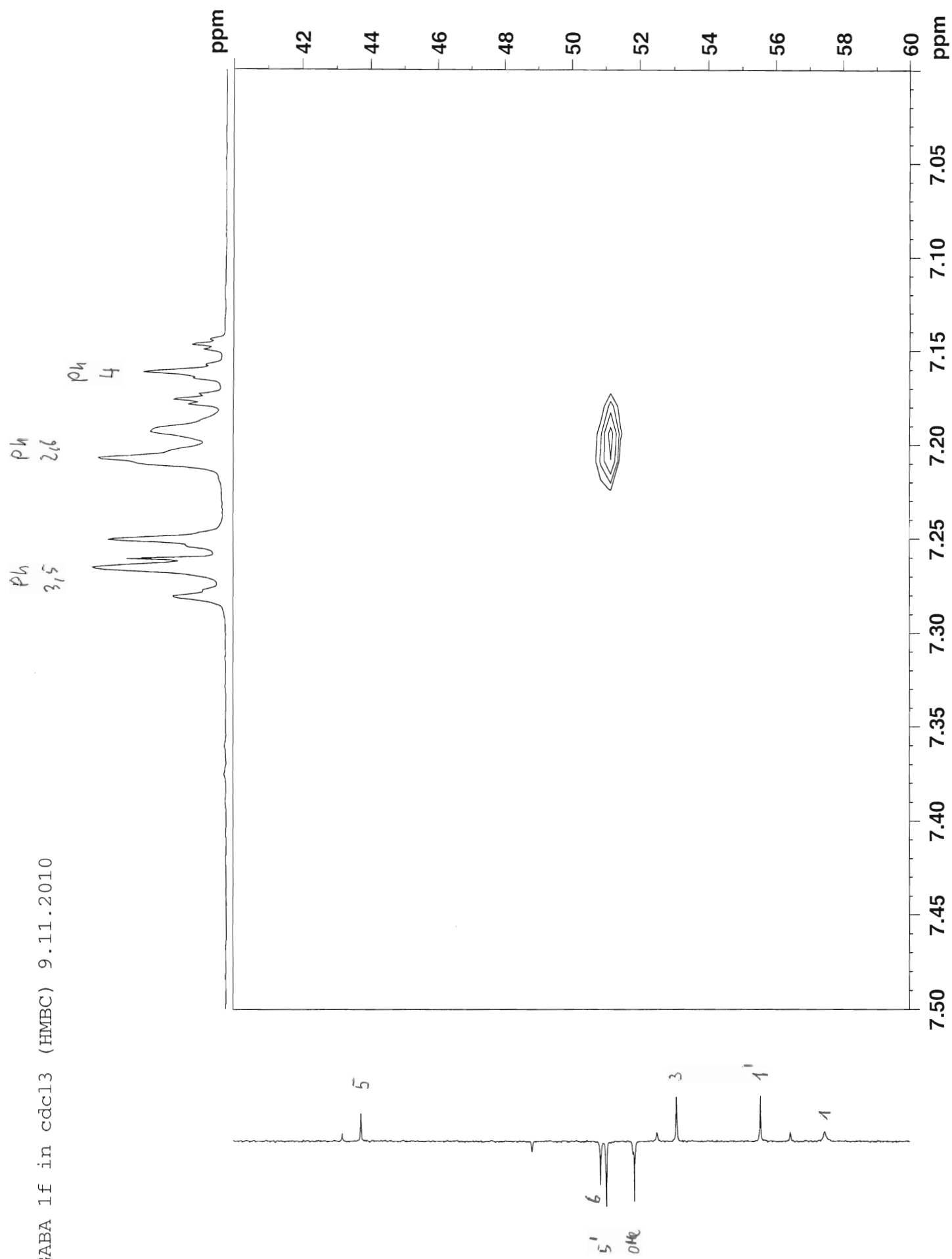




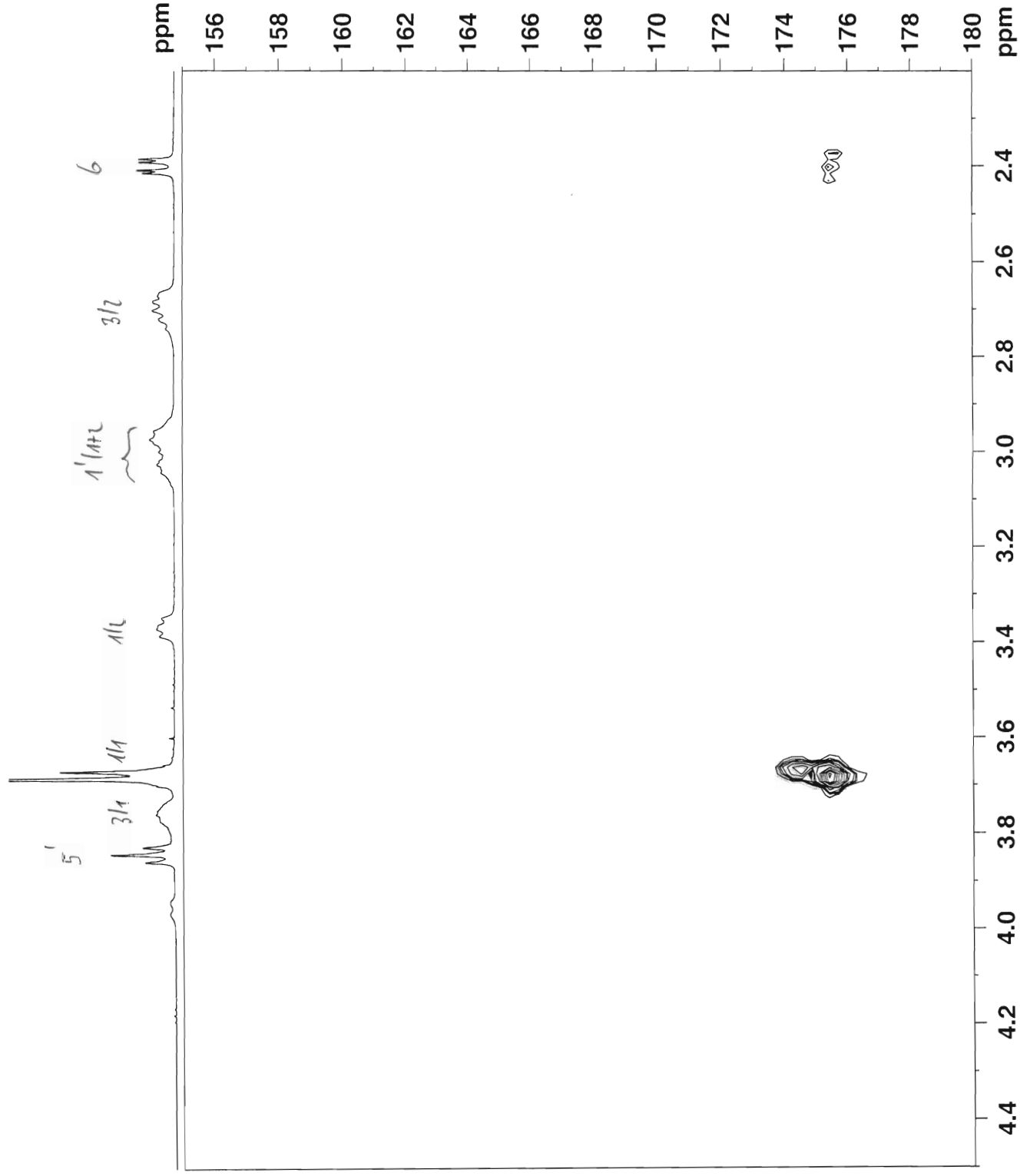
GABA 1f in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010







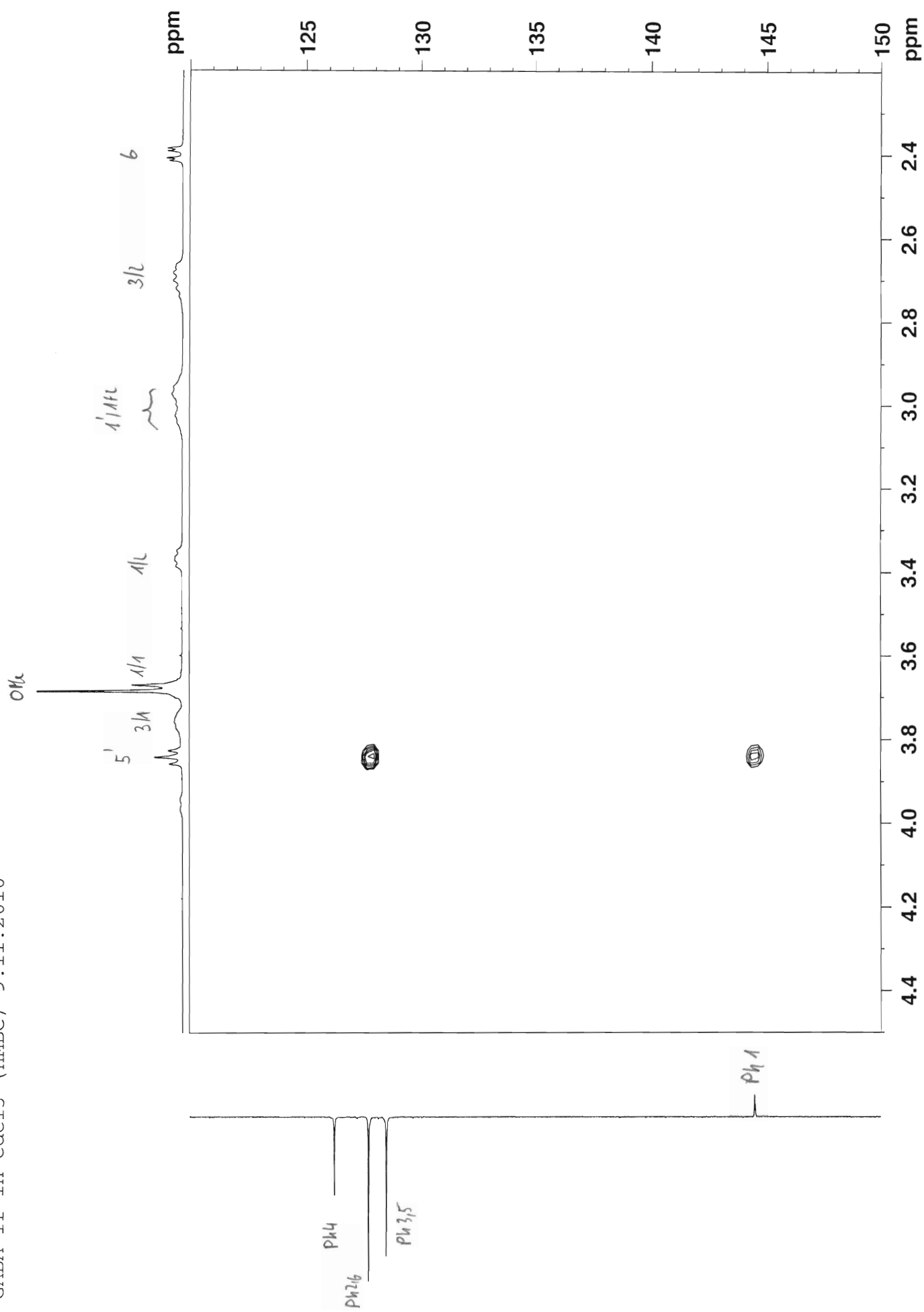
OMe

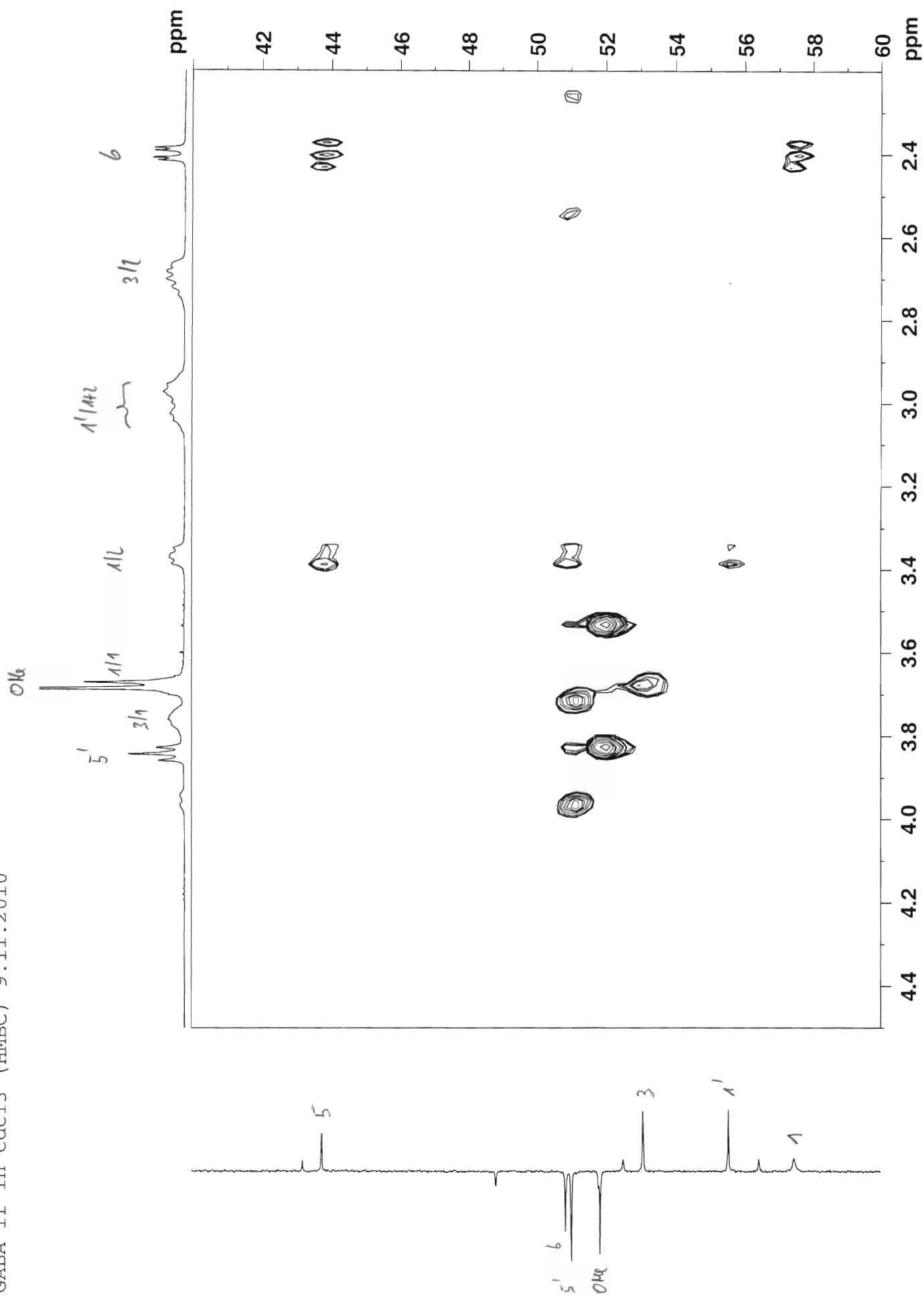


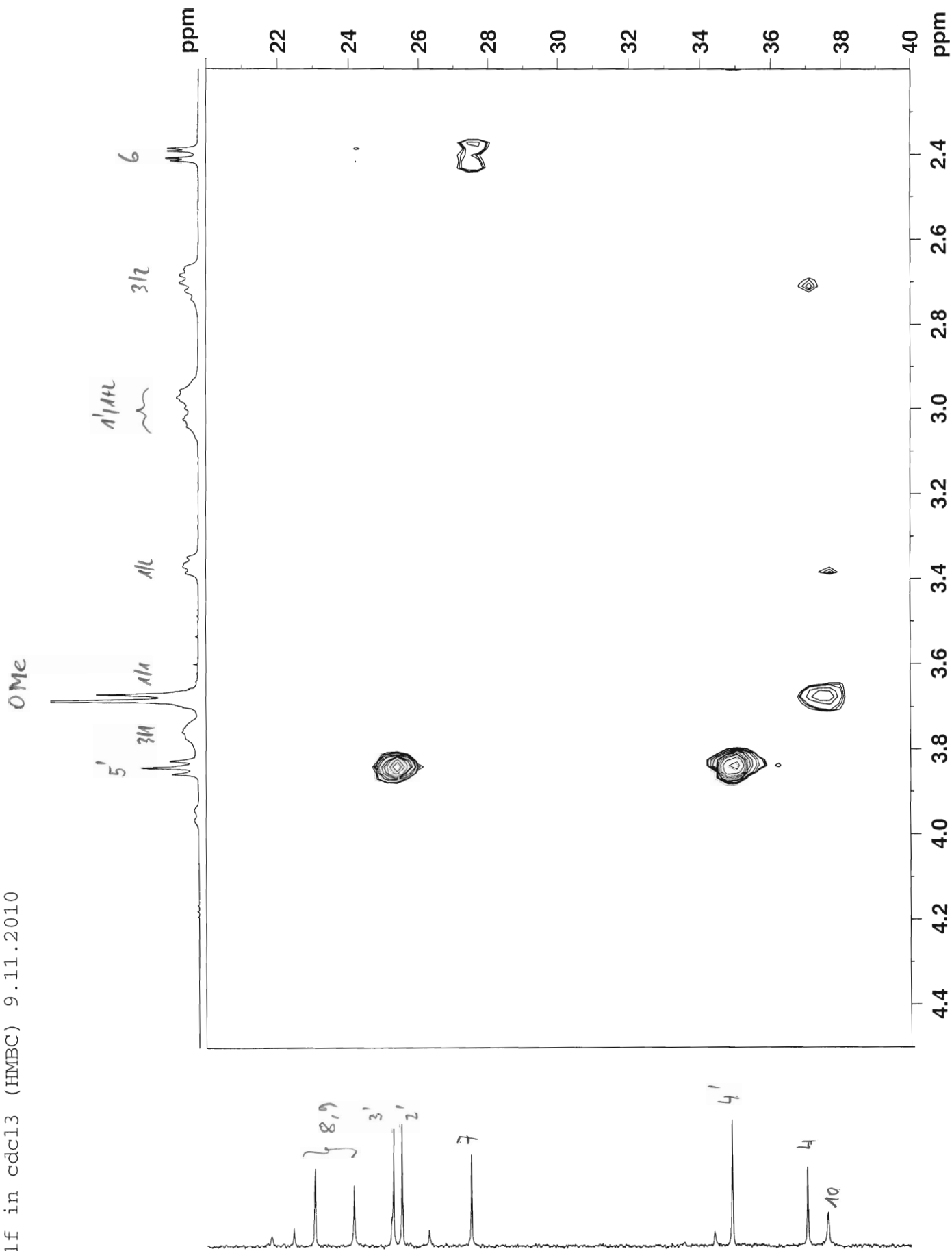
Oxalat COO

Ester COO

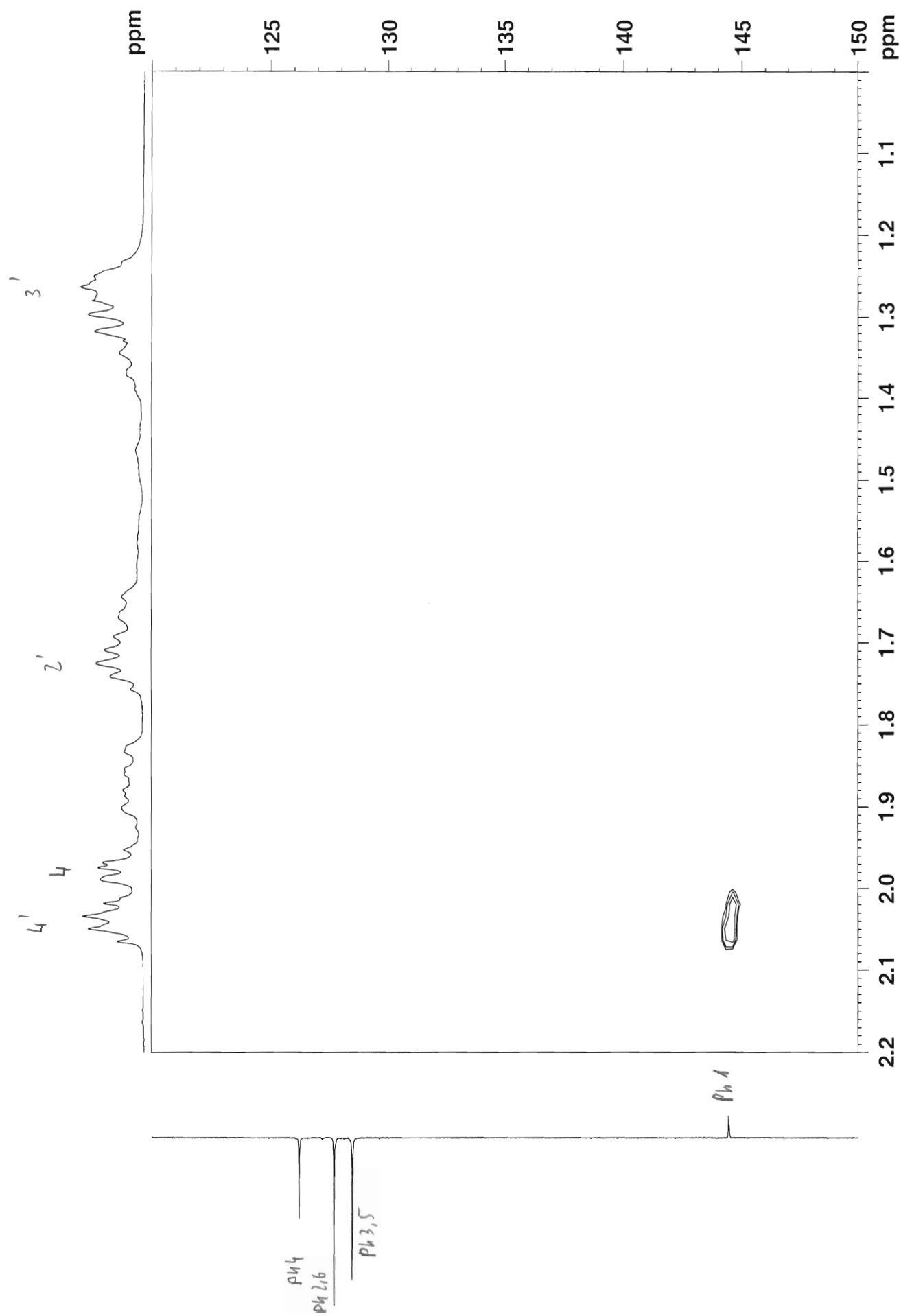
GABA 1f in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



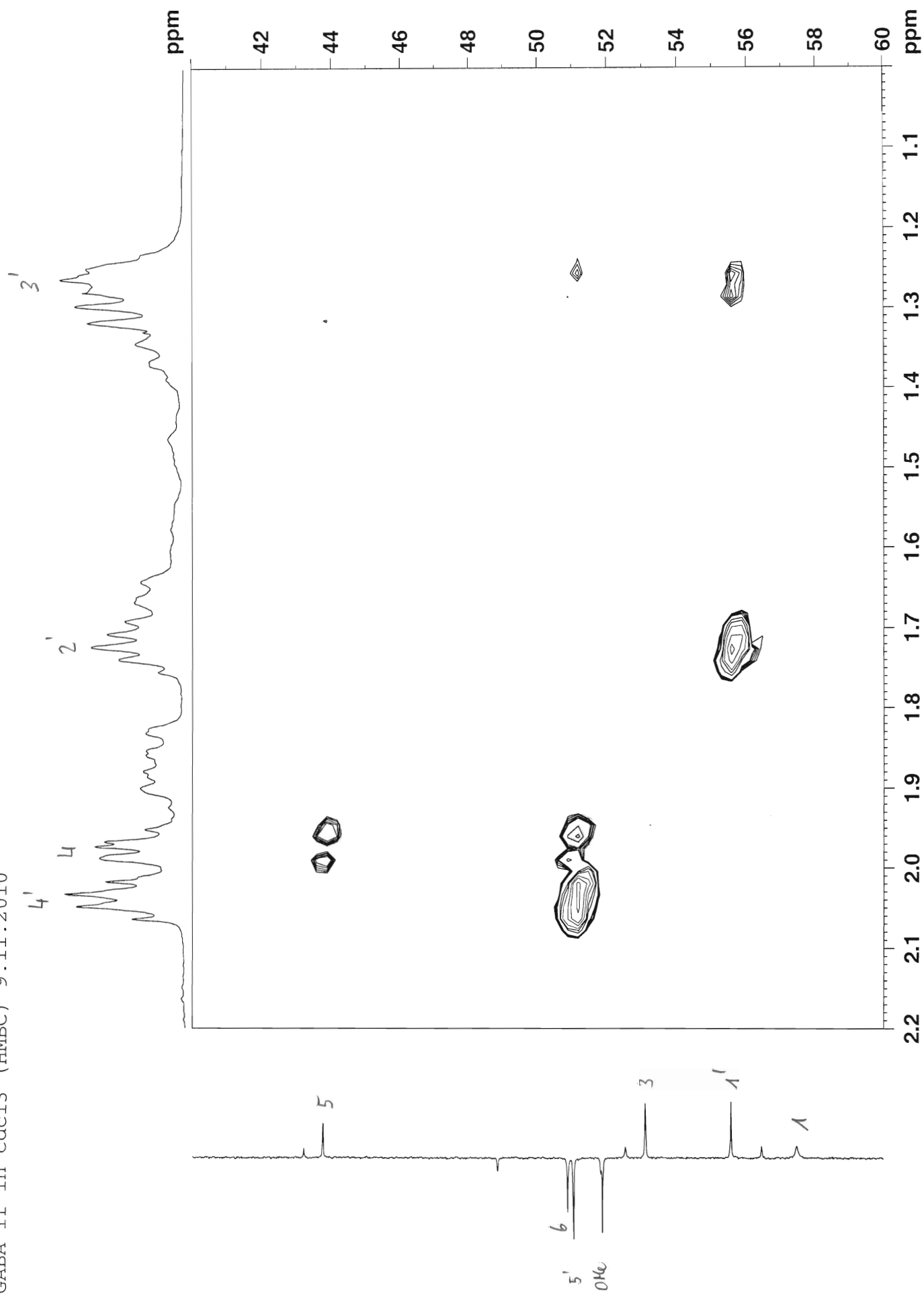




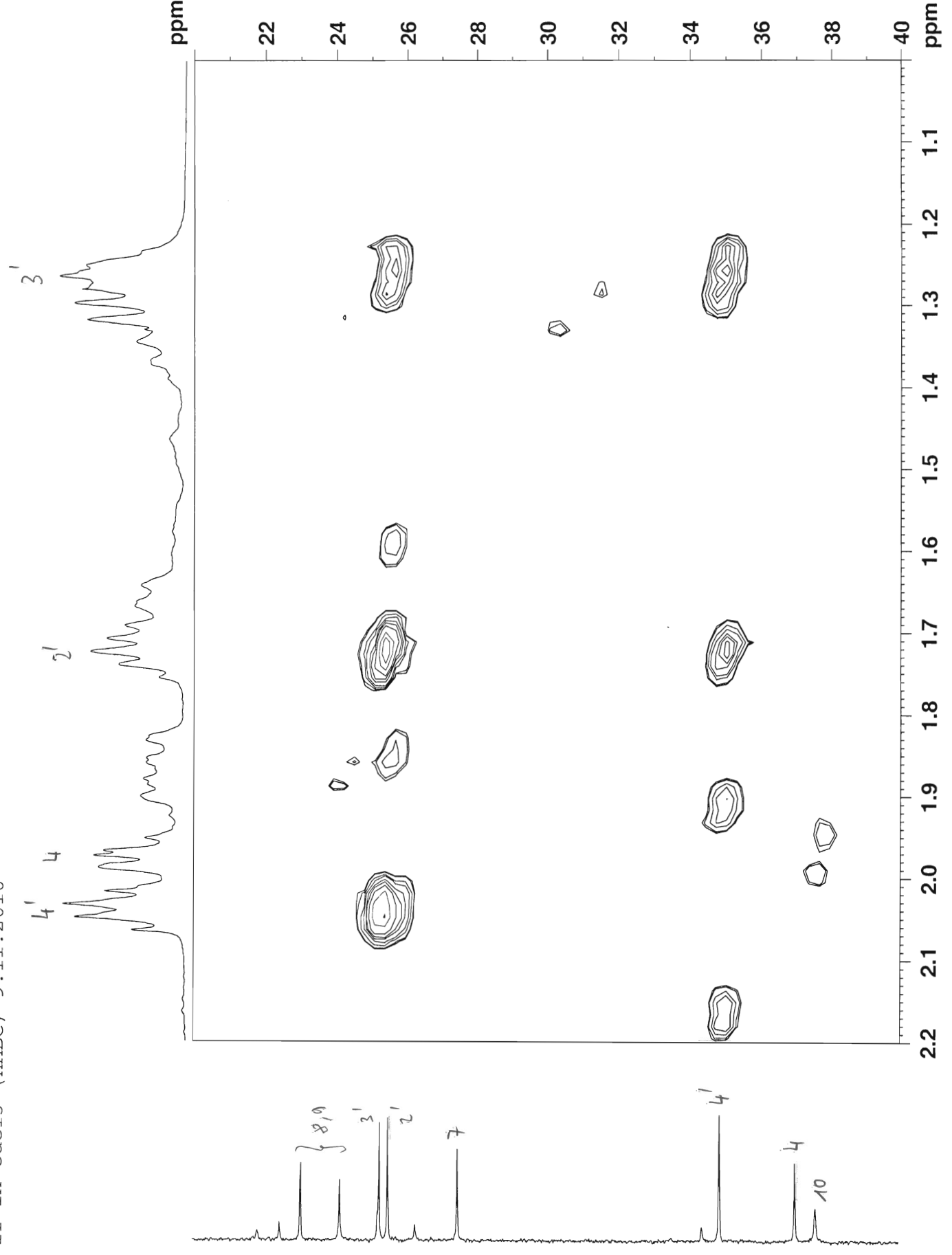
GABA 1f in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

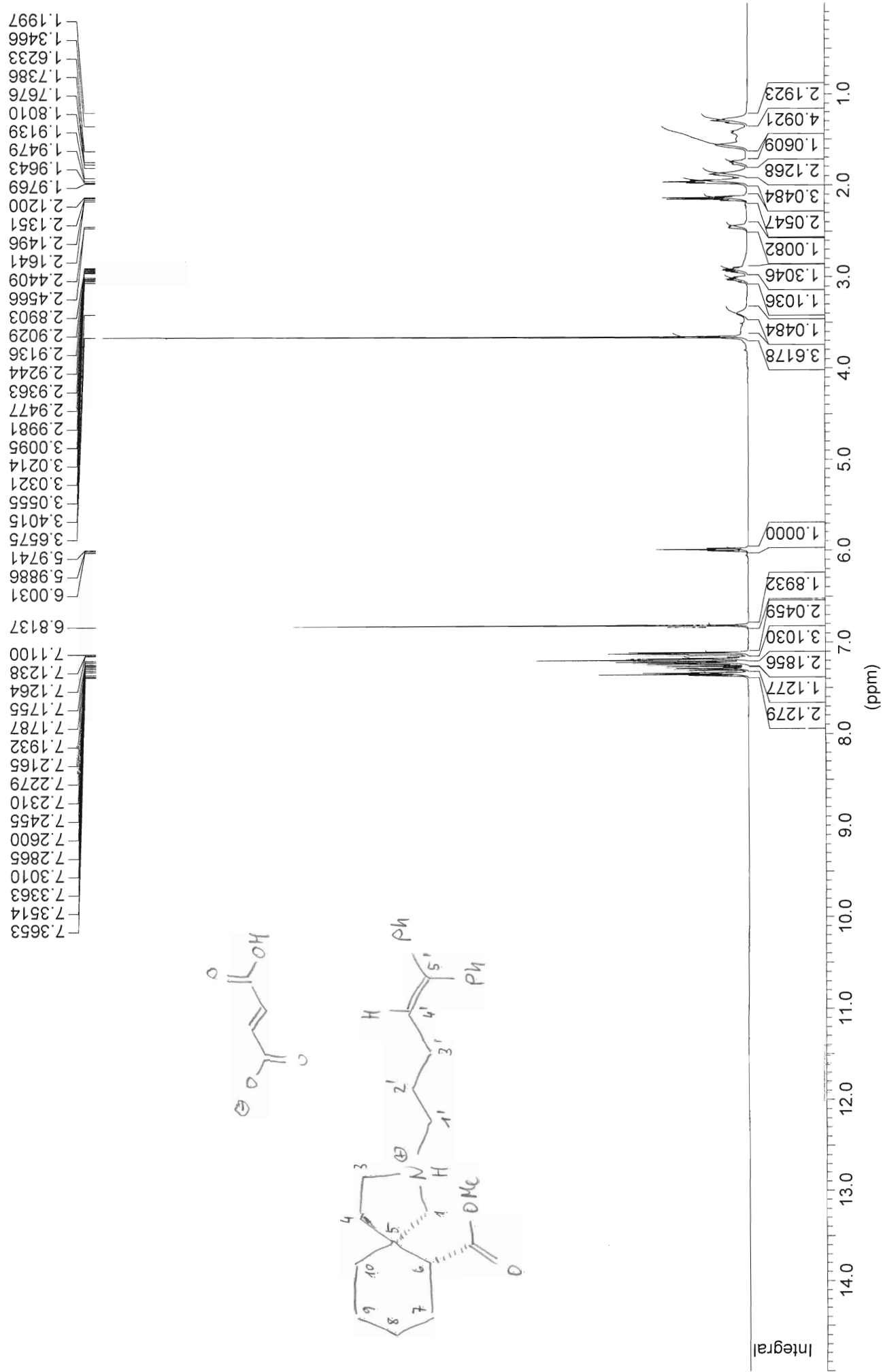


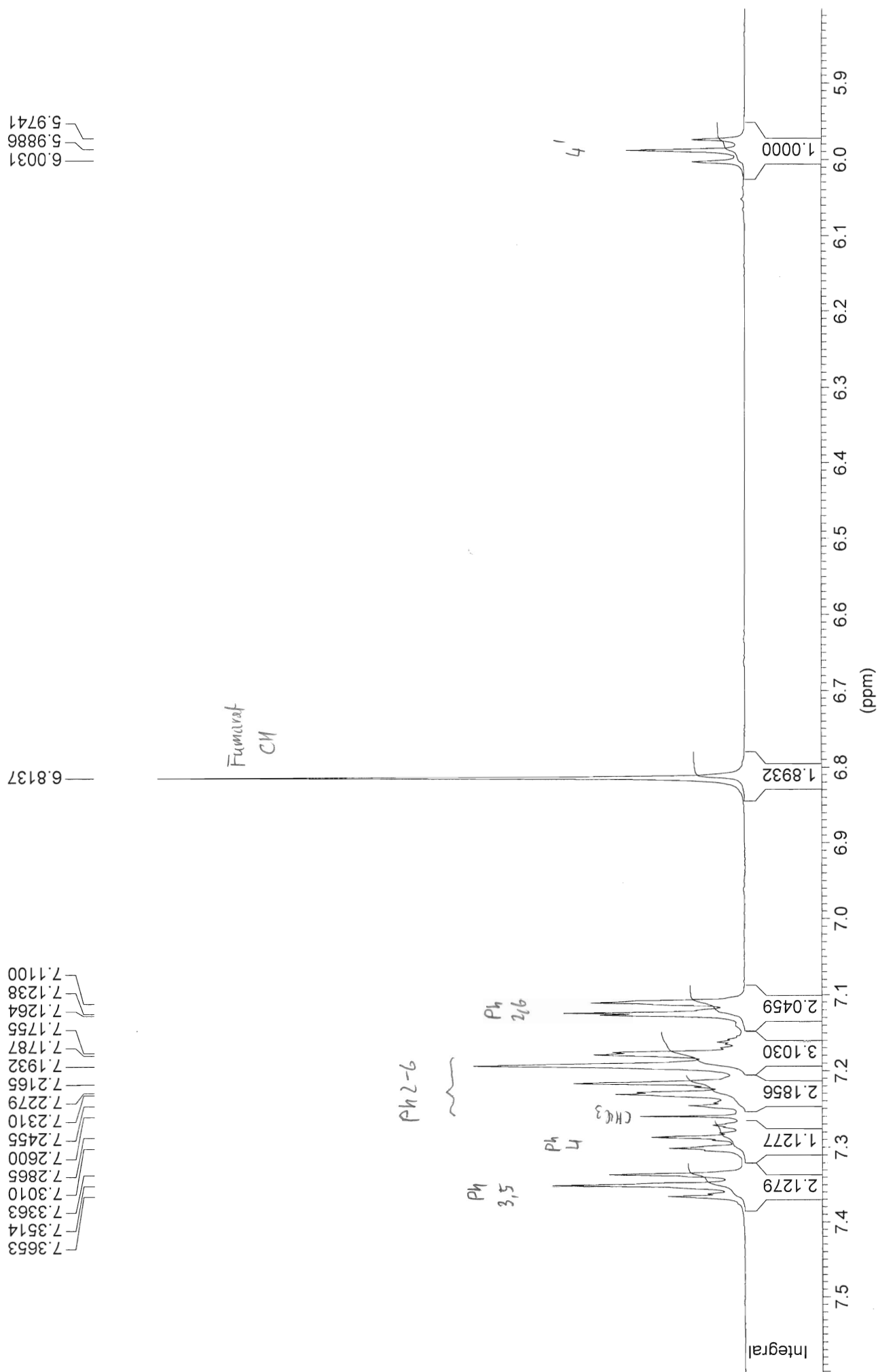
GABA 1f in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

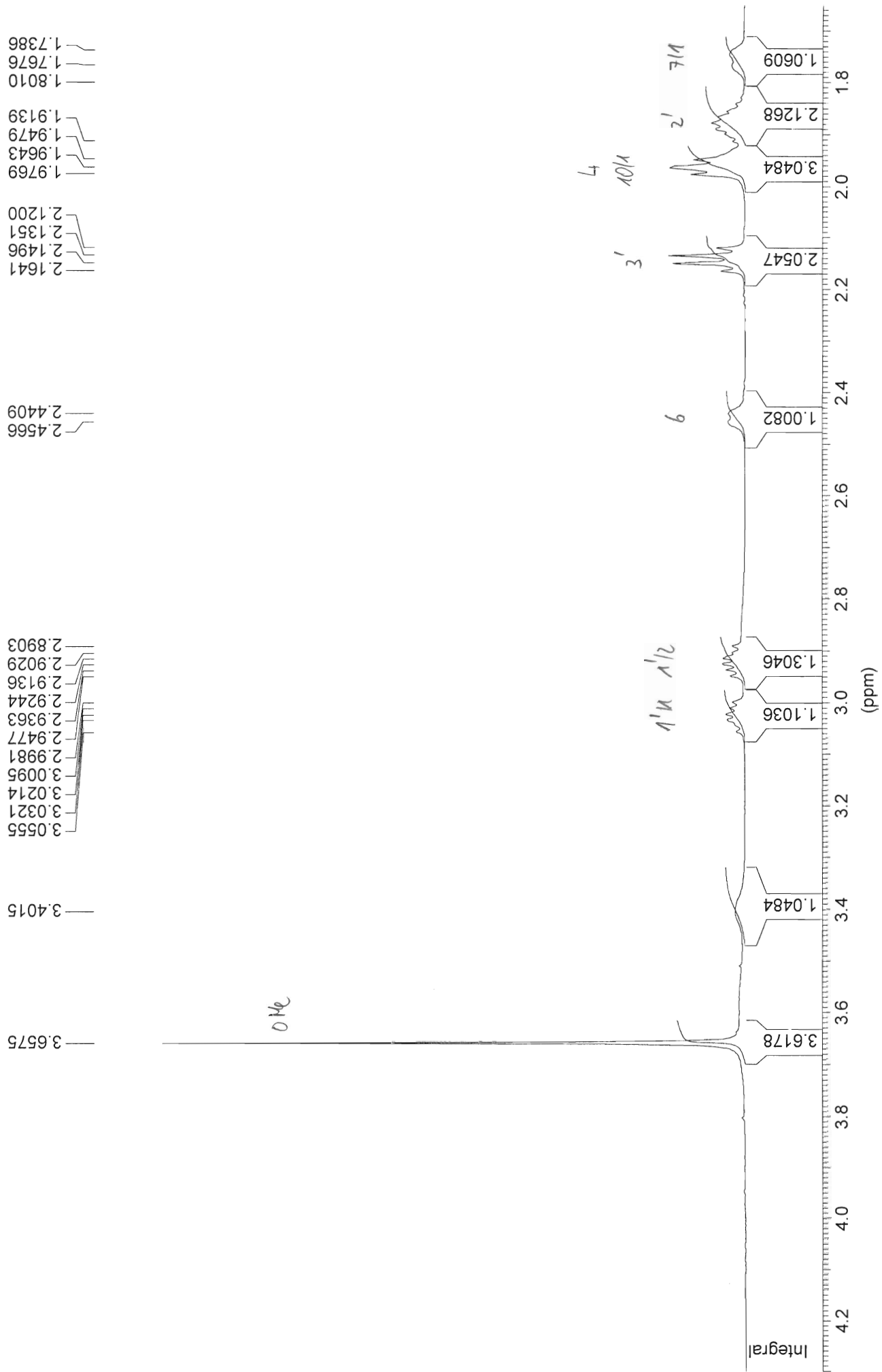


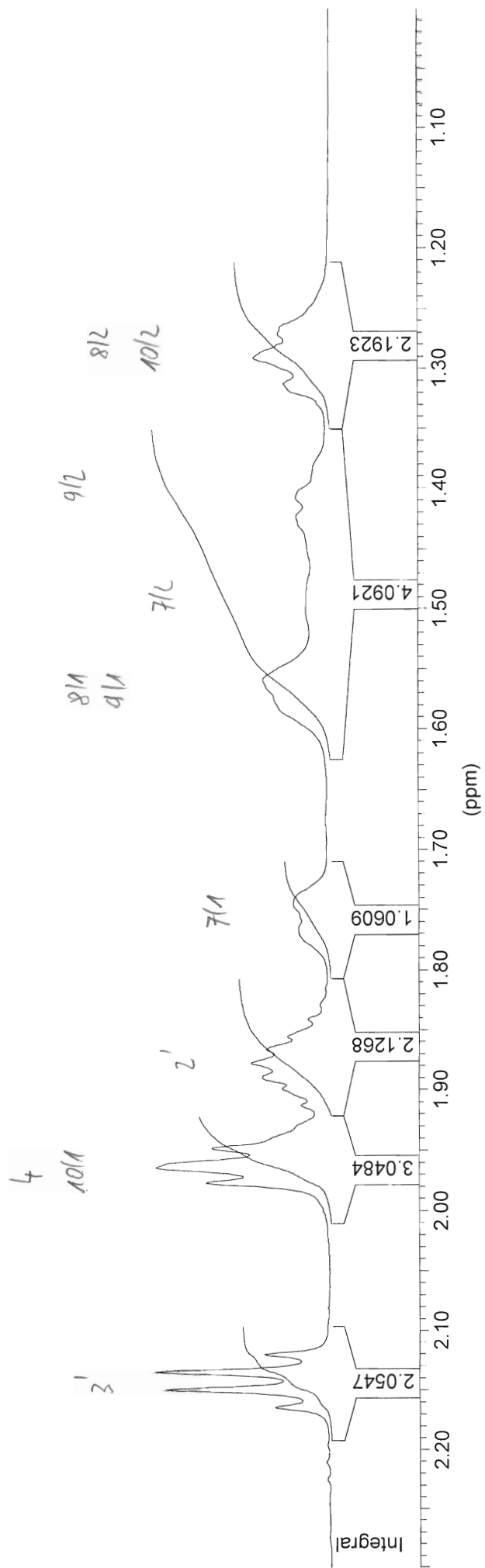
GABA 1f in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

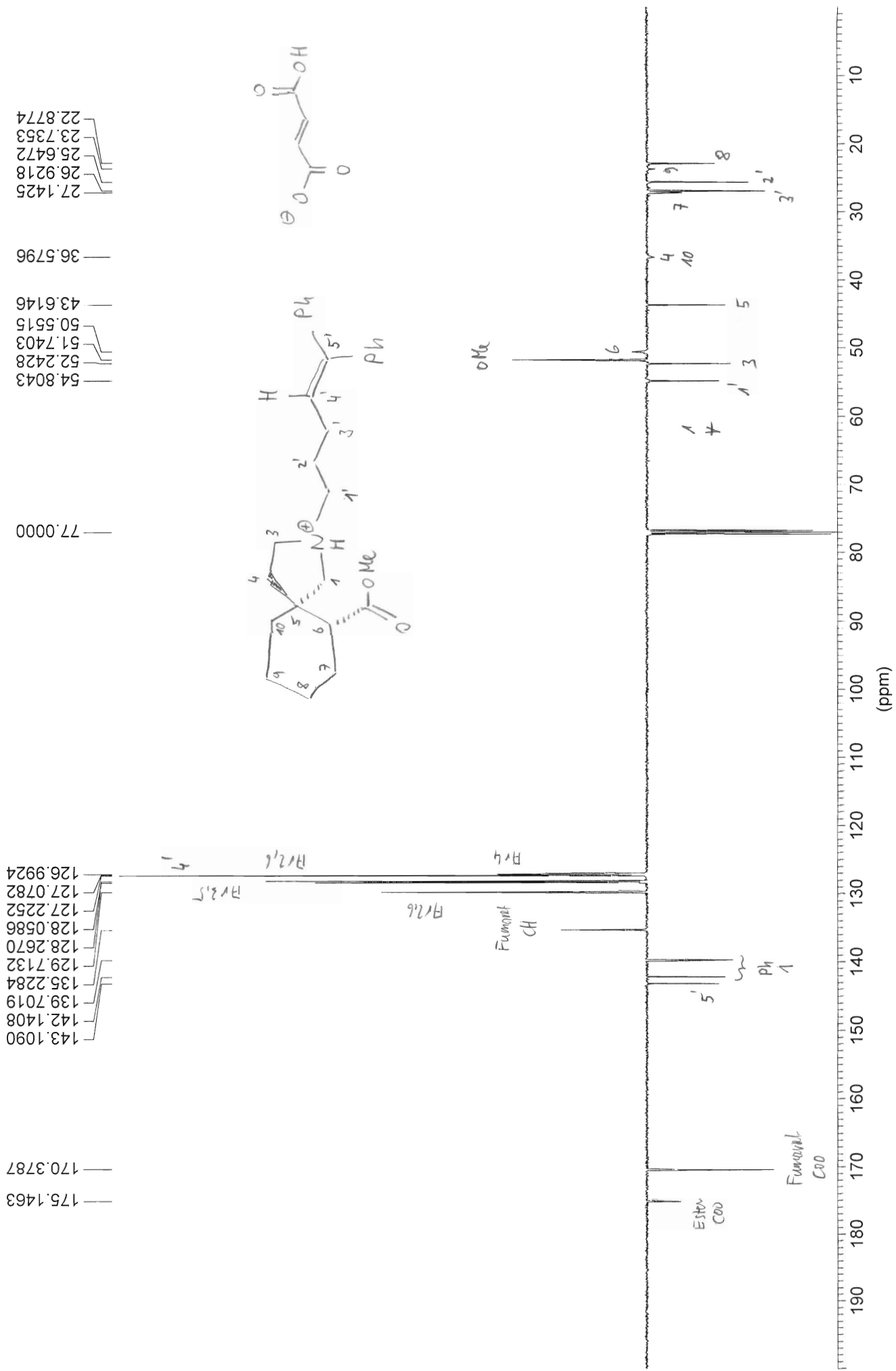


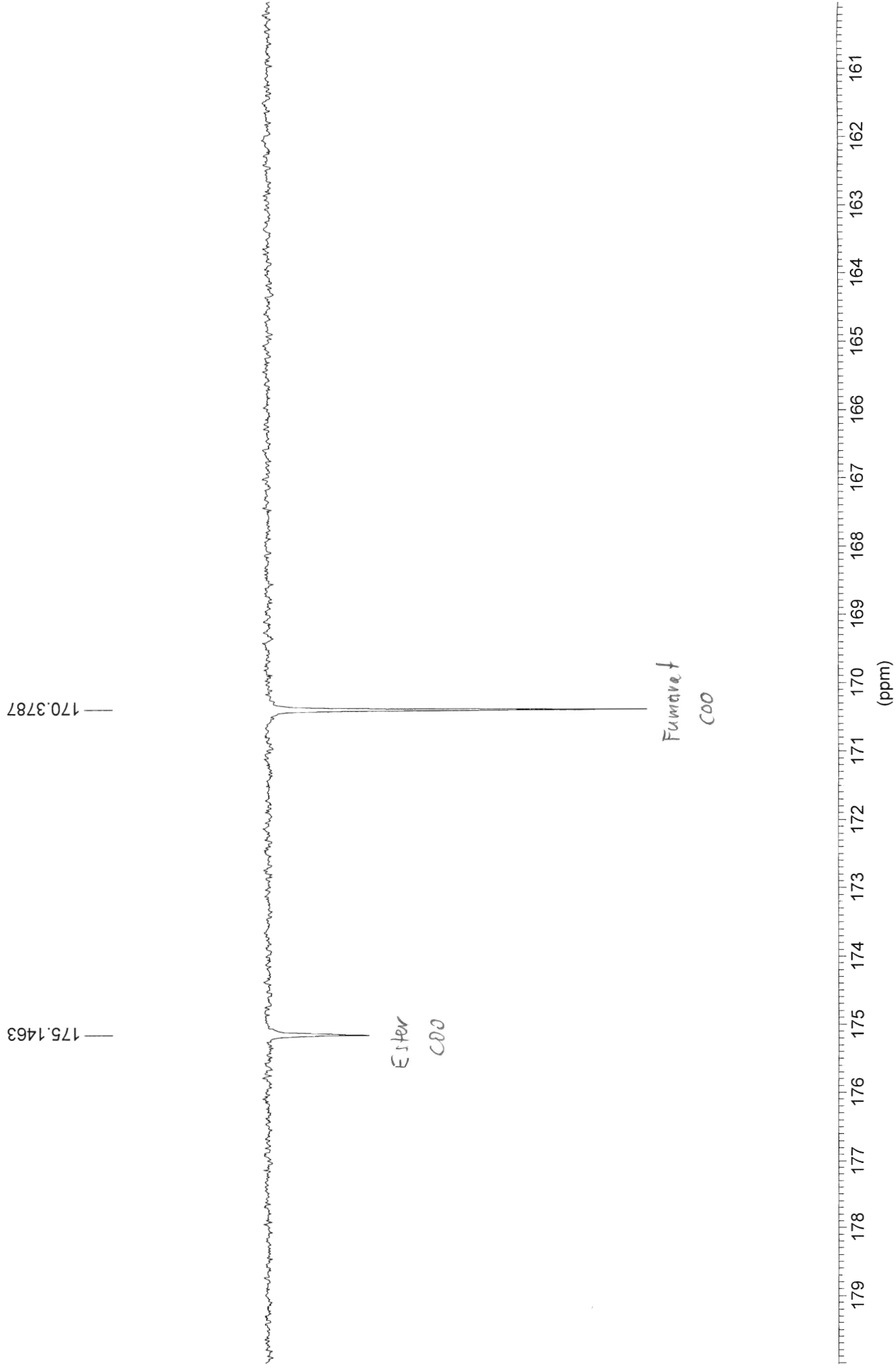


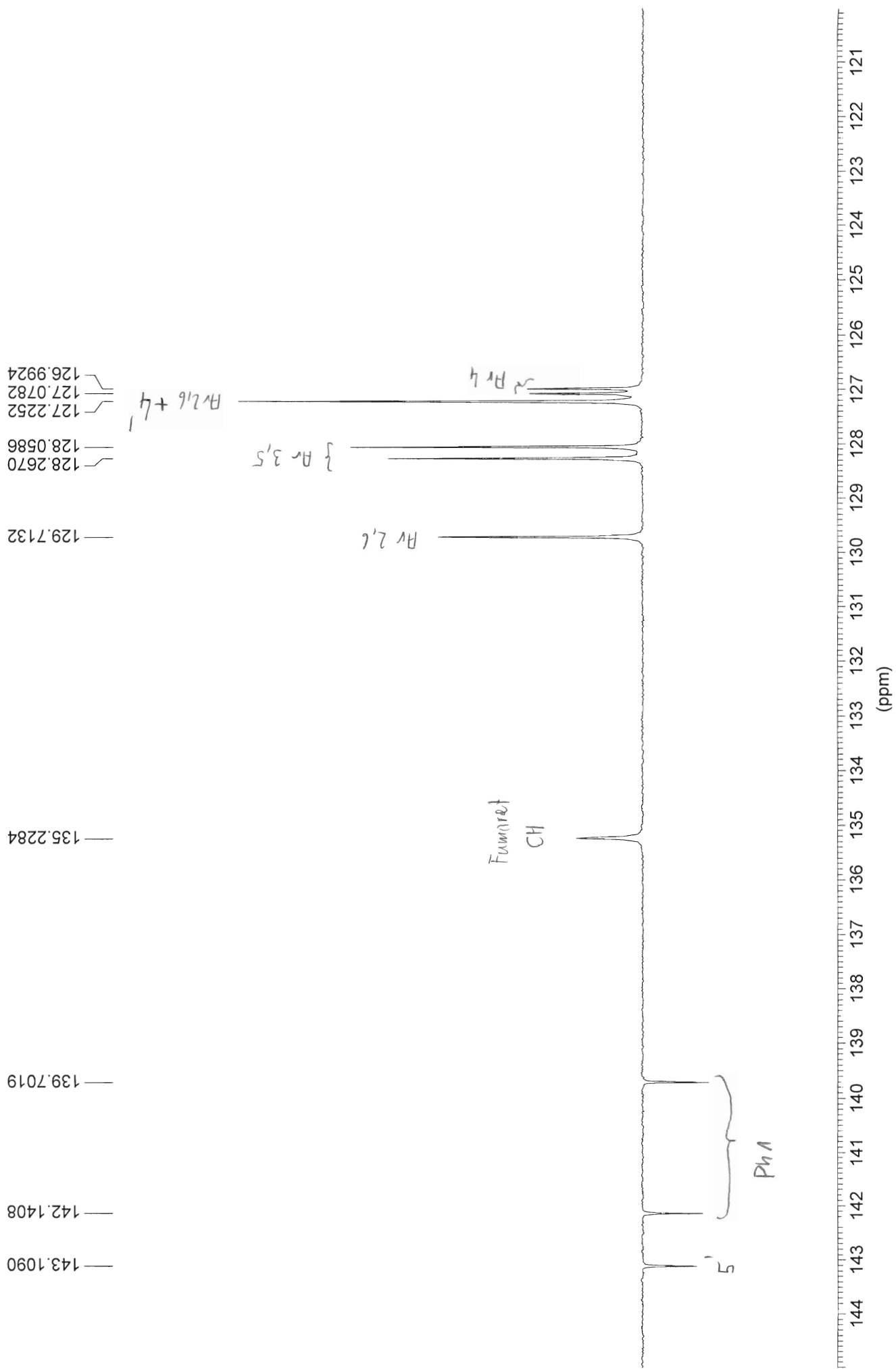


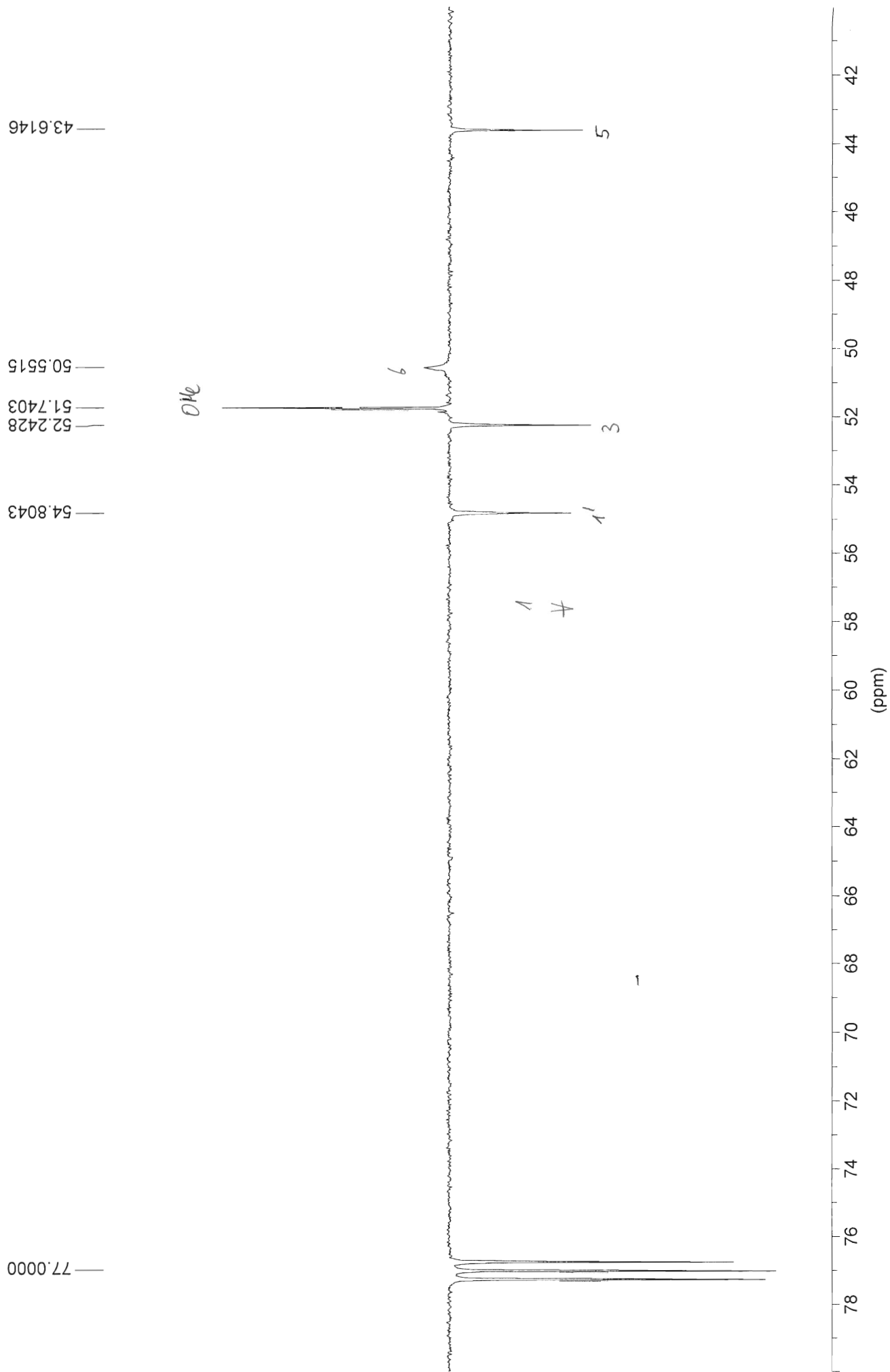


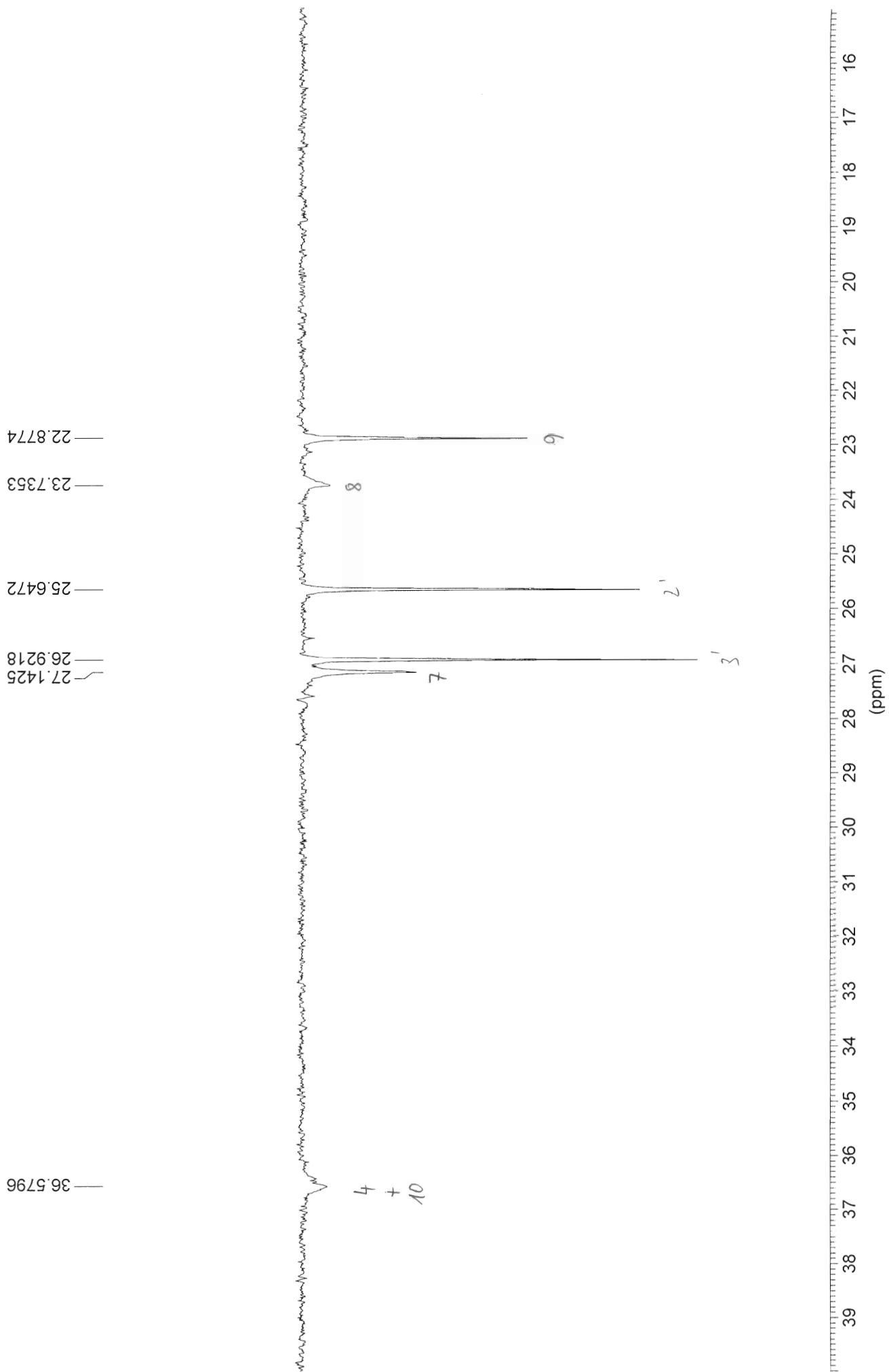




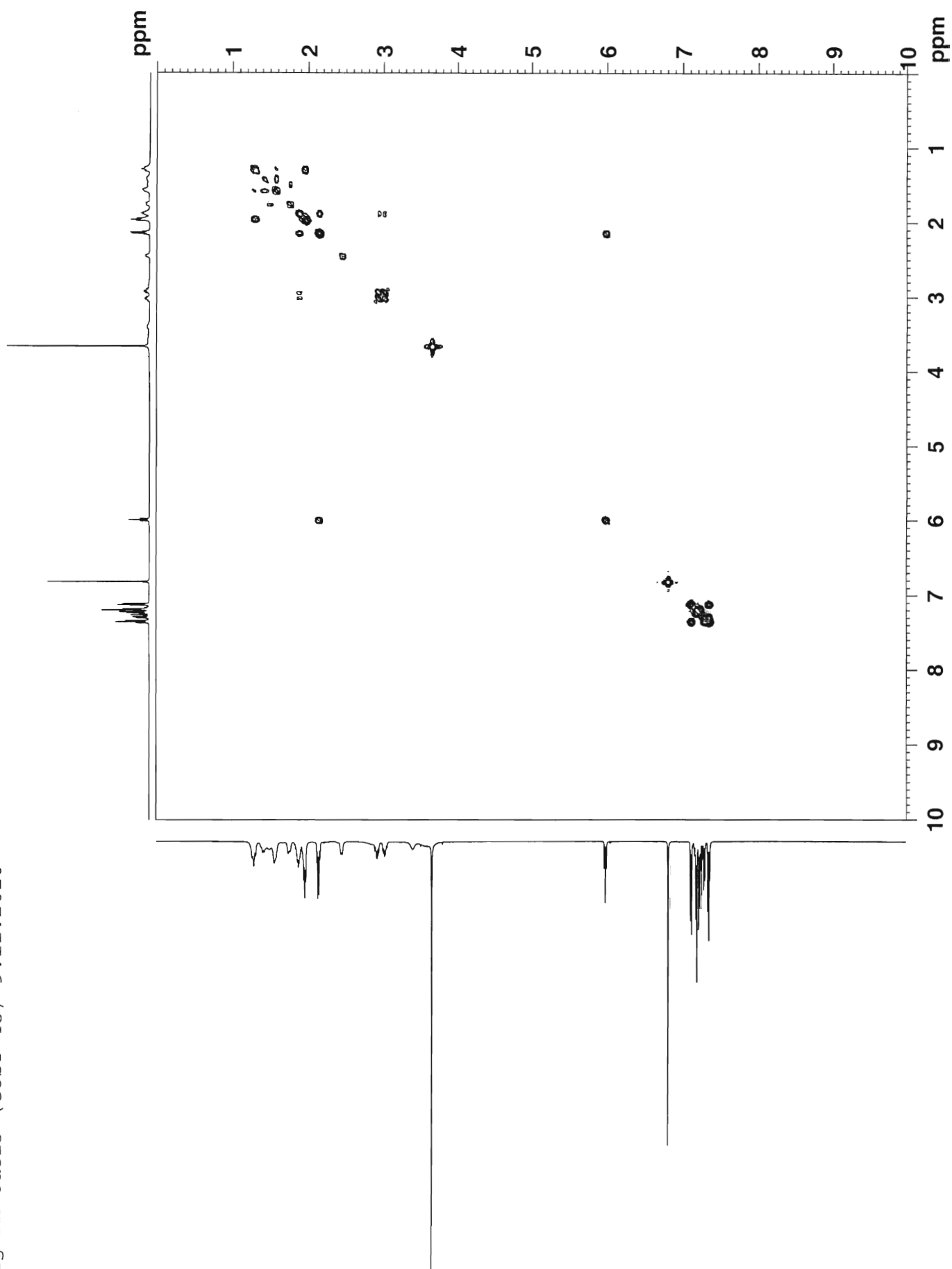


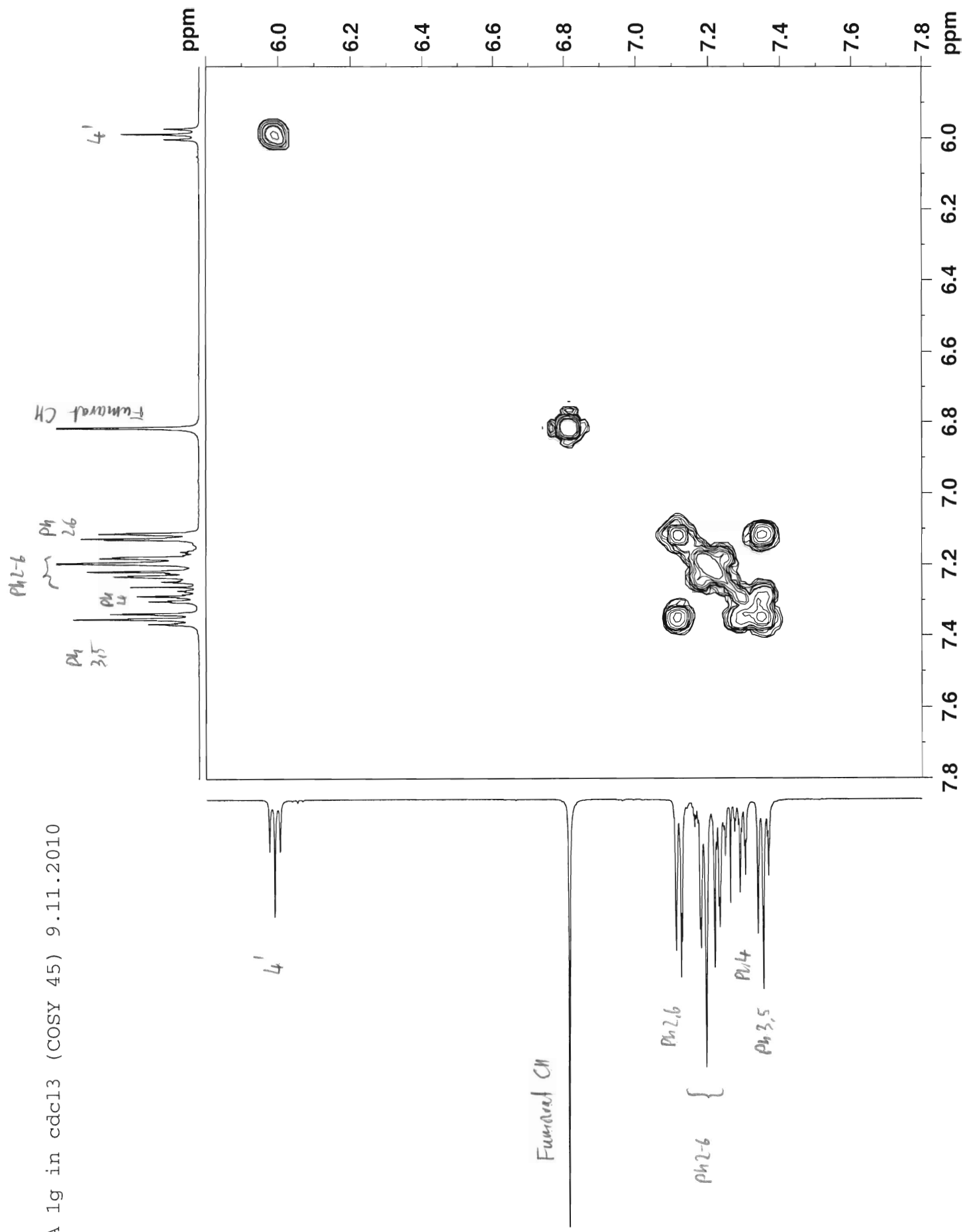


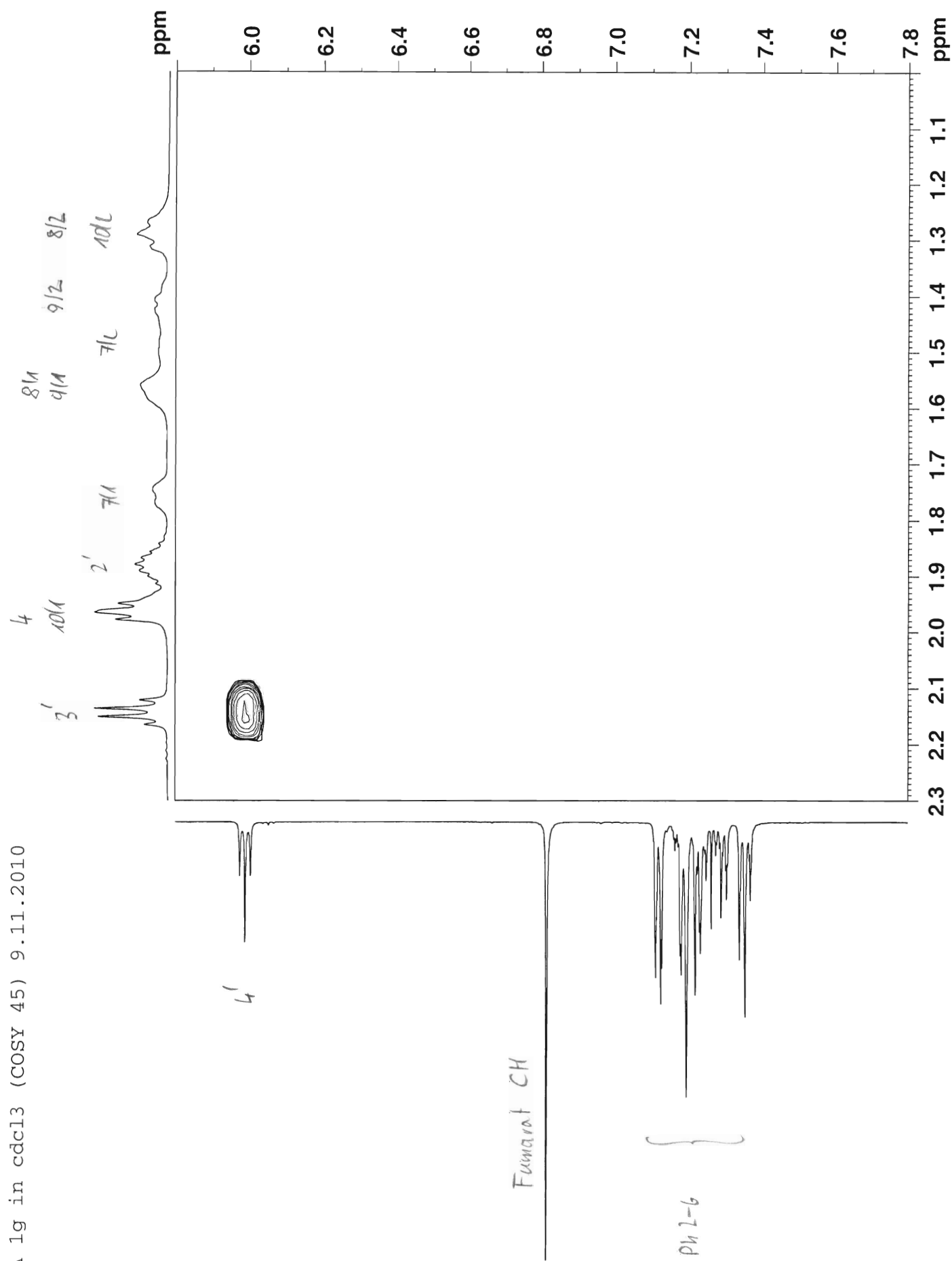


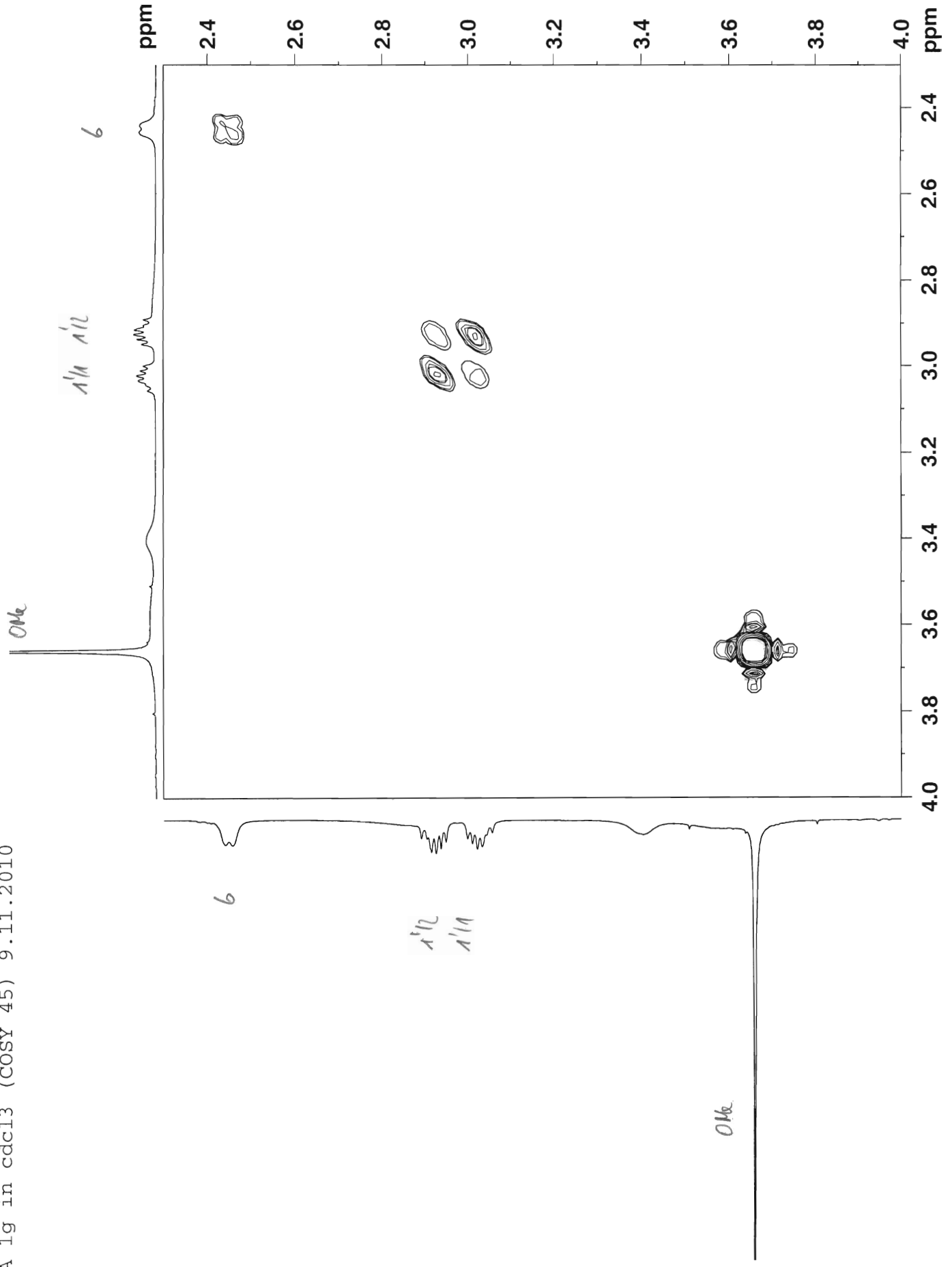


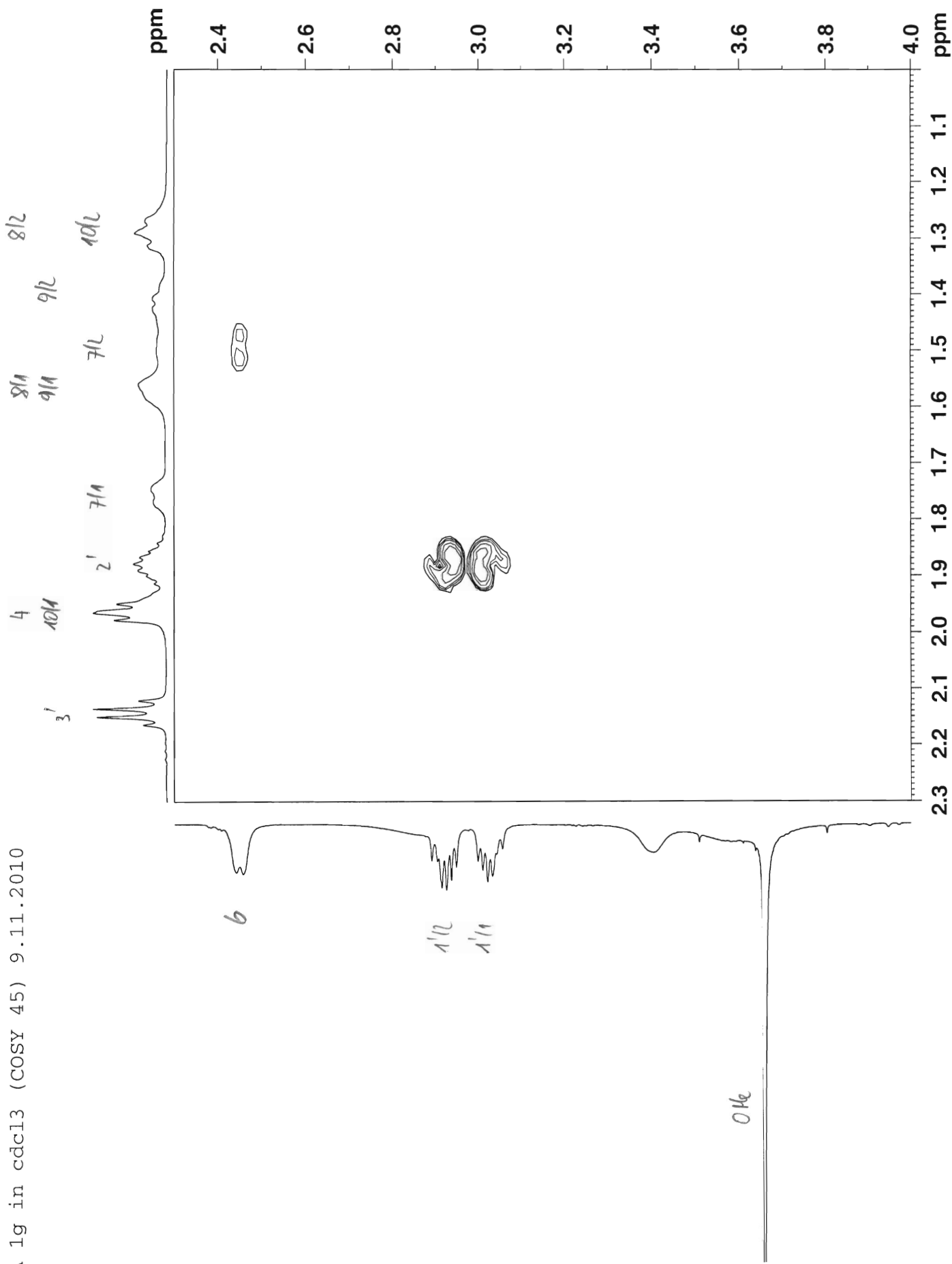
GABA 1g in cdcl3 (COSY 45) 9.11.2010

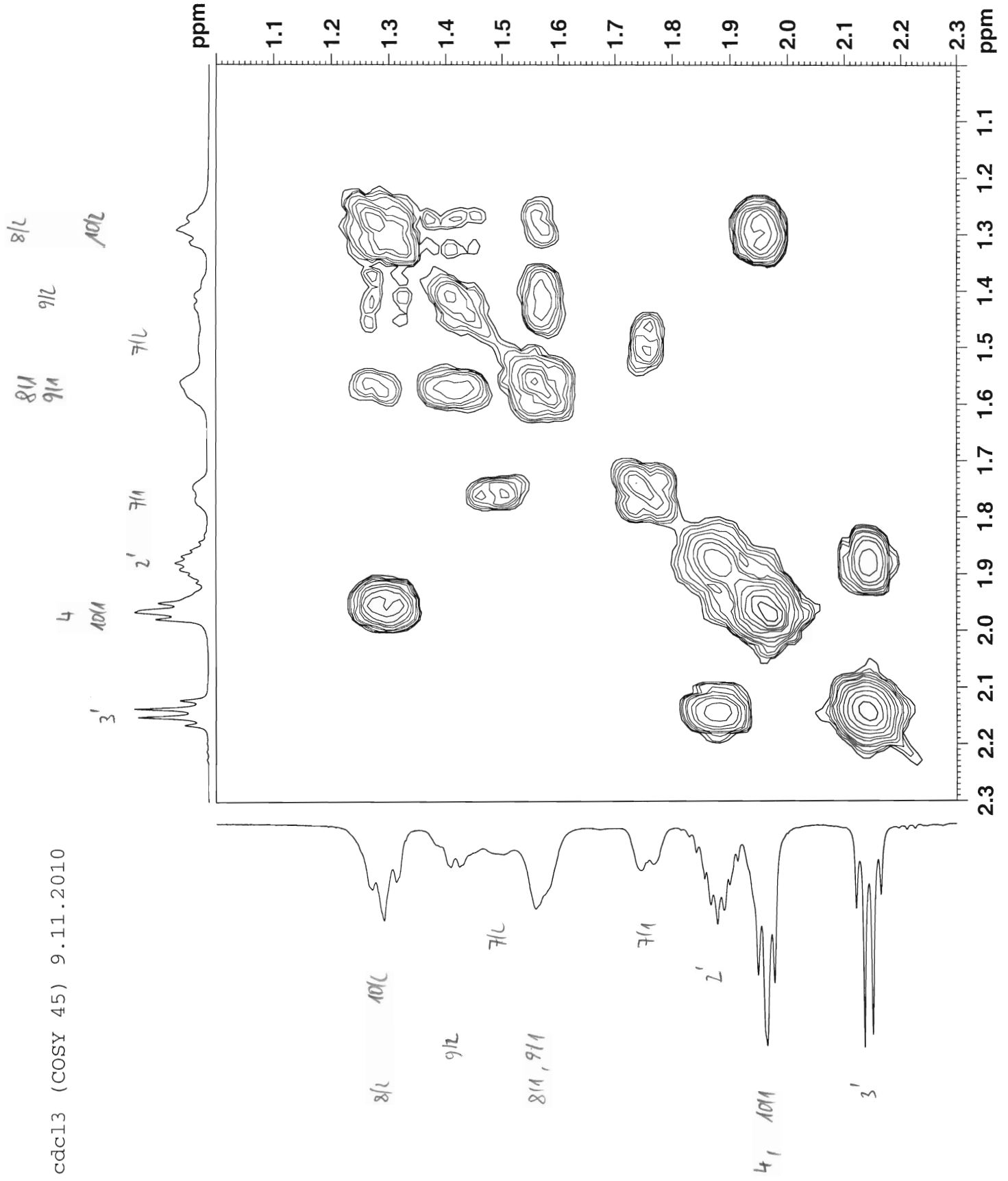




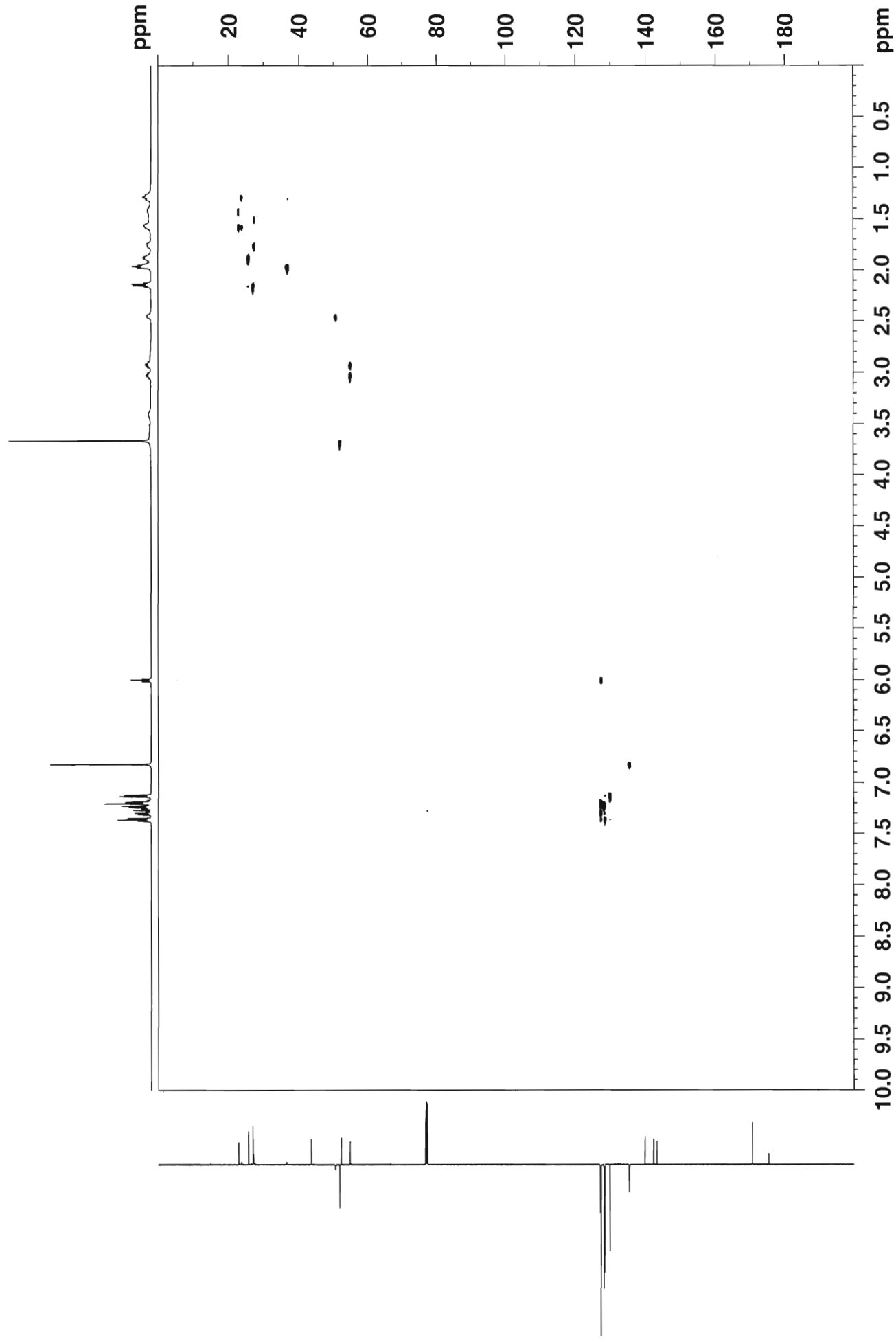


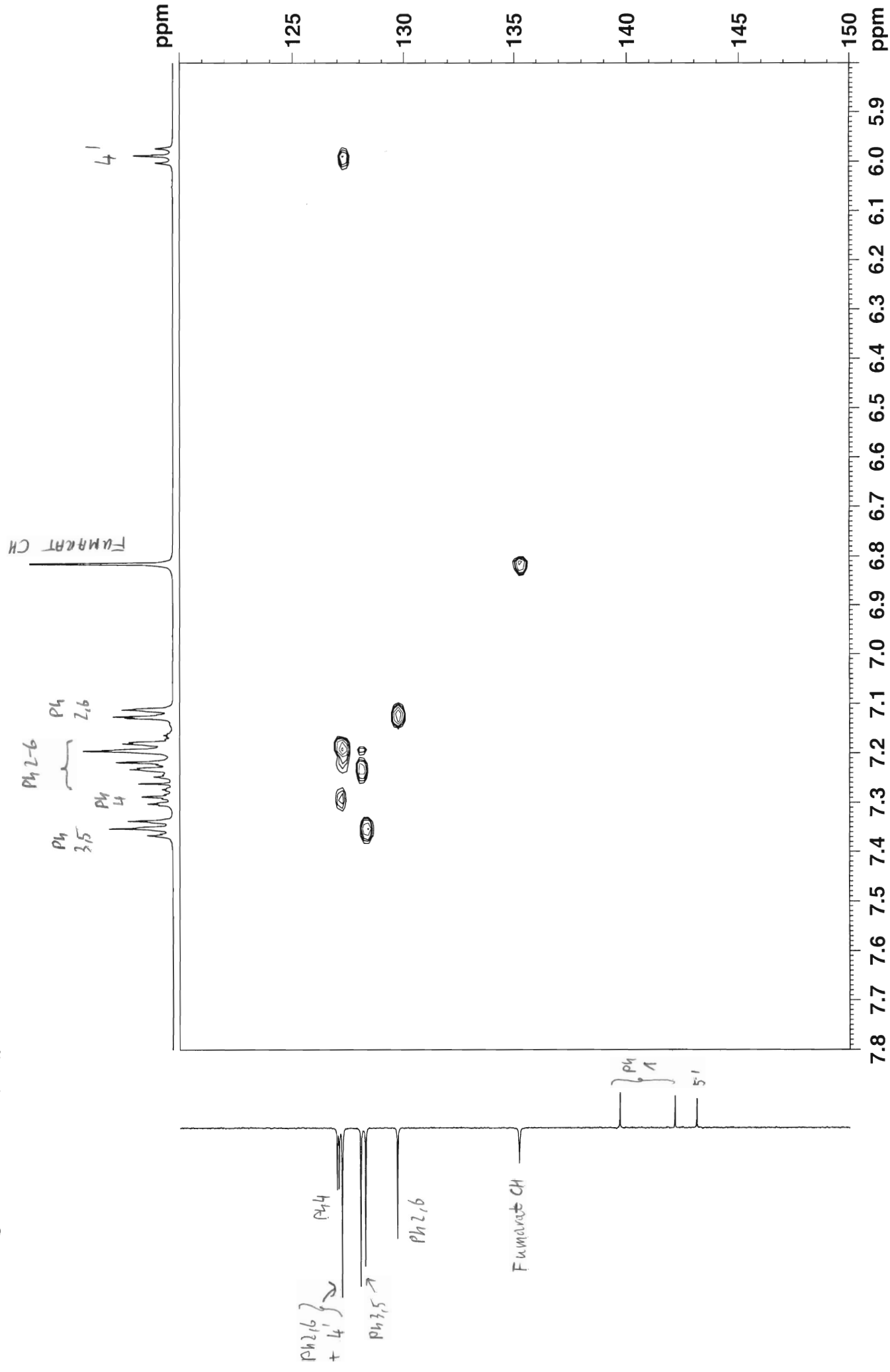


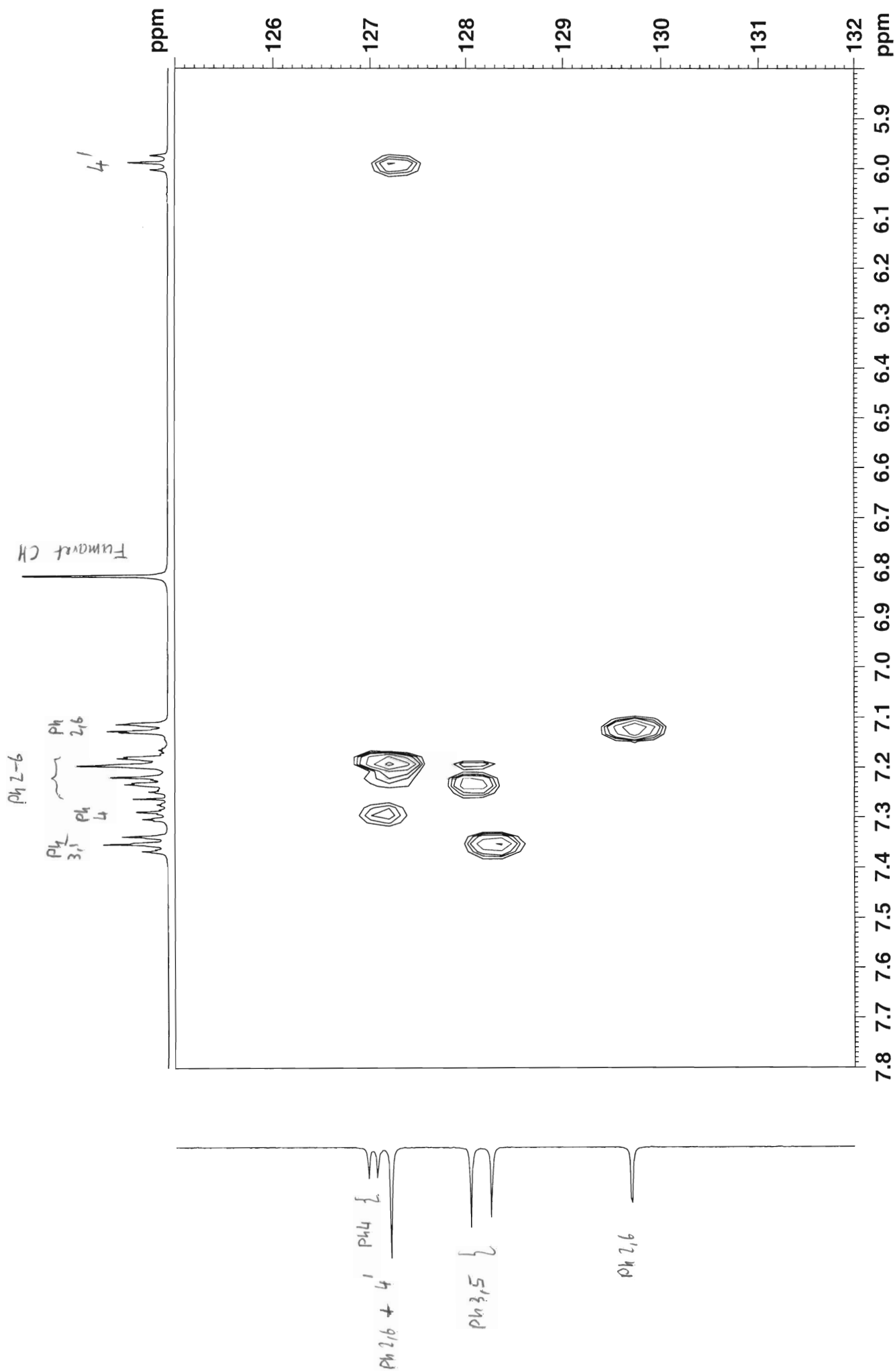




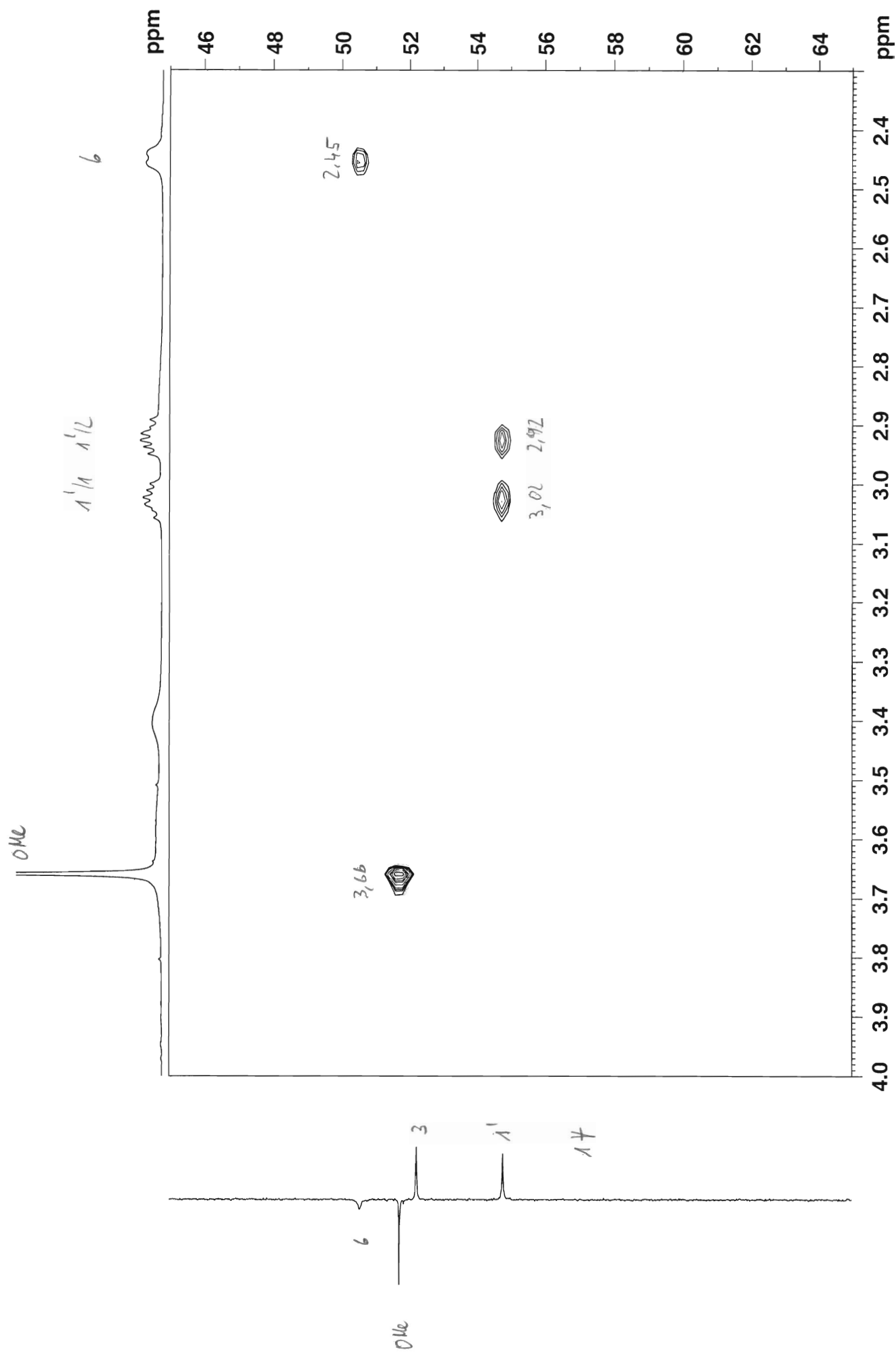
GABA 1g in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010

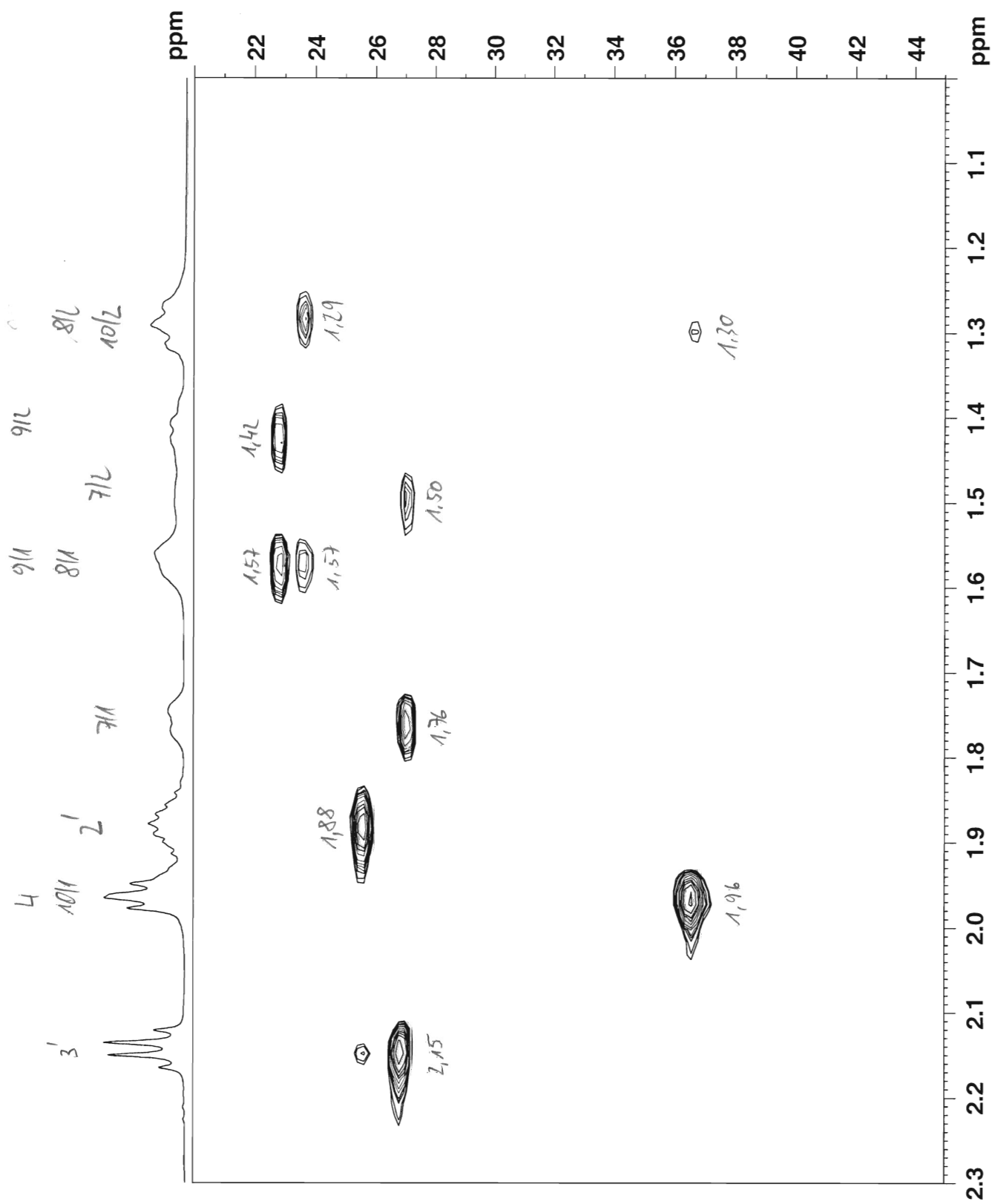




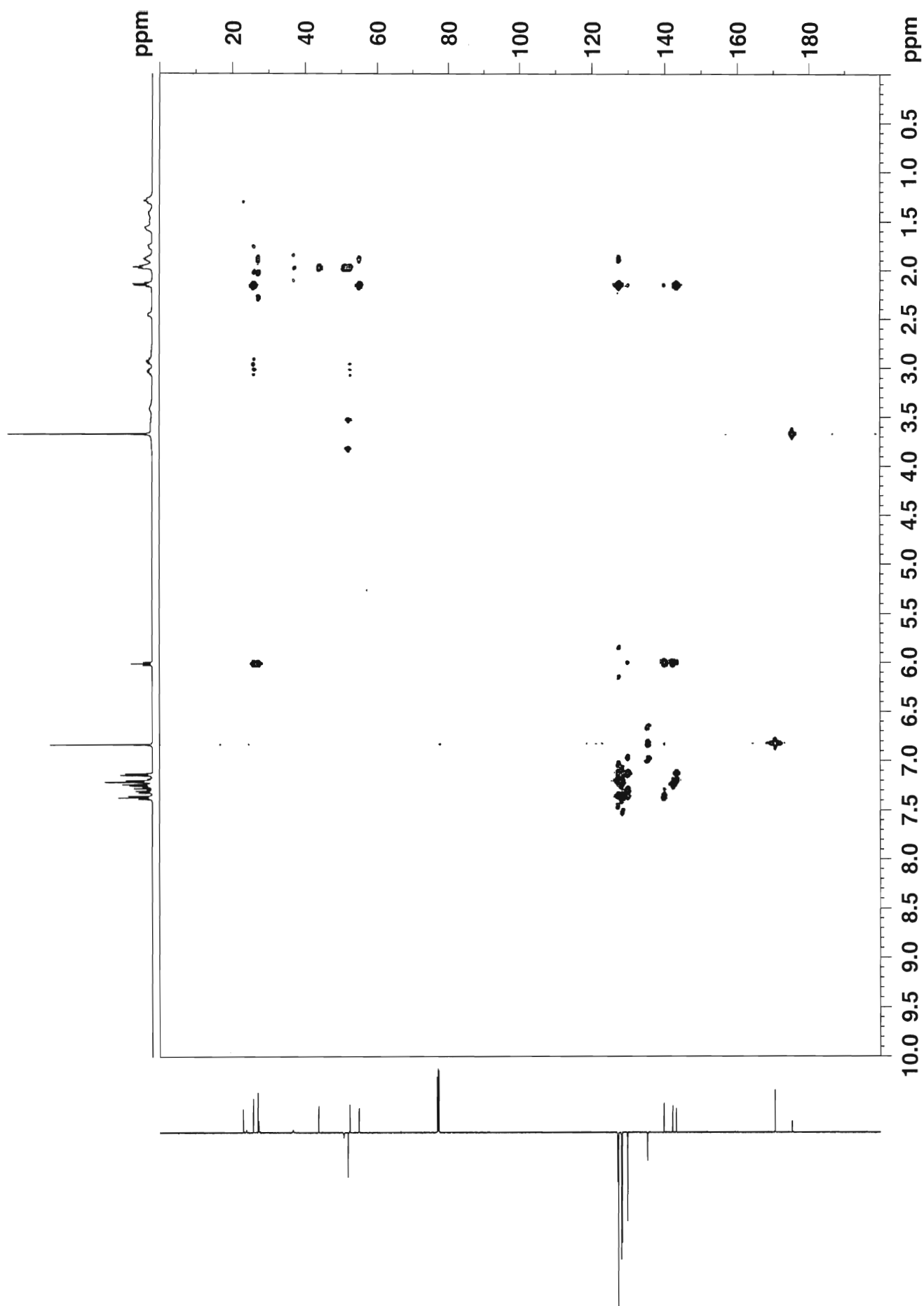


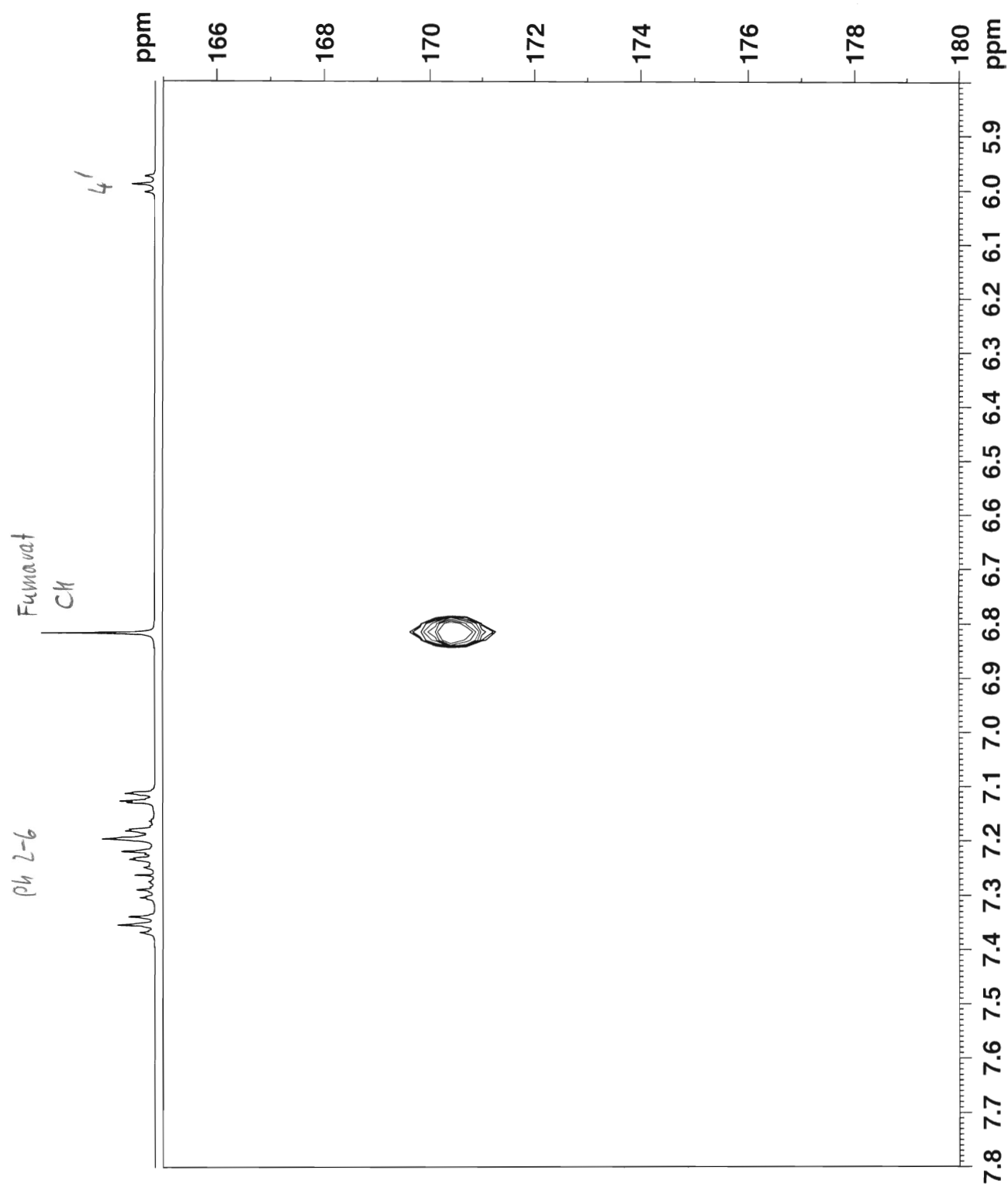
GABA 1g in cdcl3 (HSQC) 9.11.2010

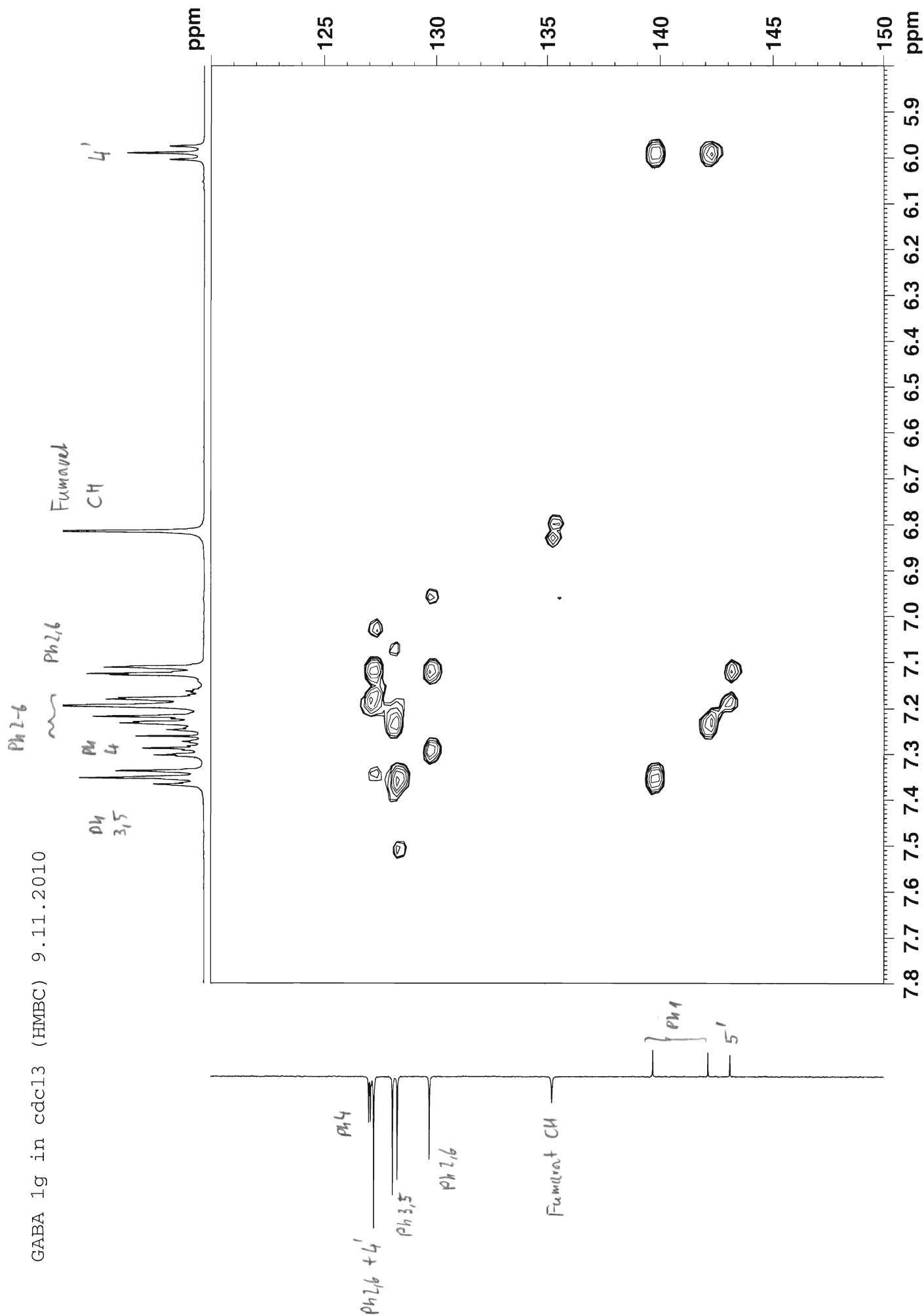




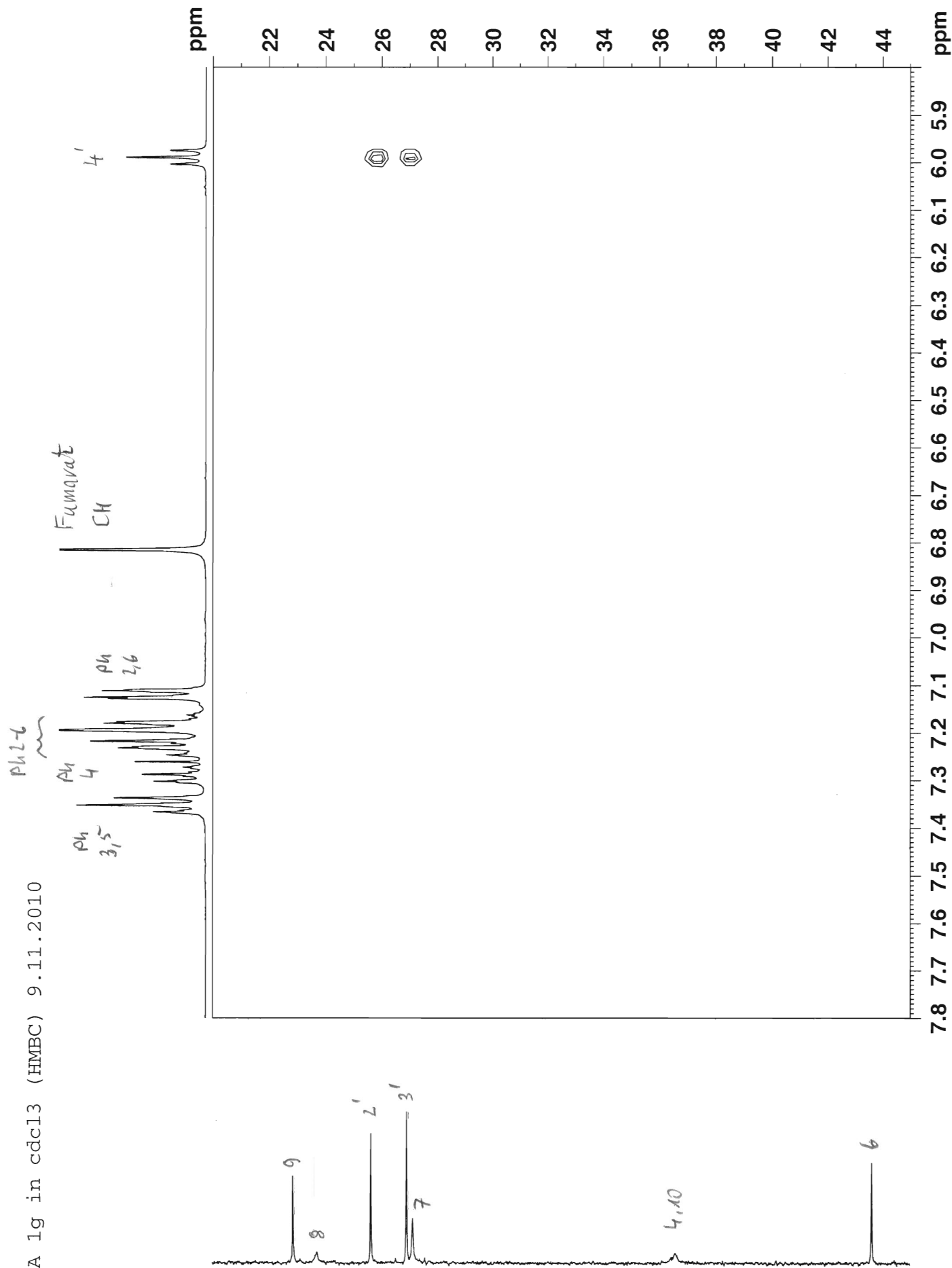
GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



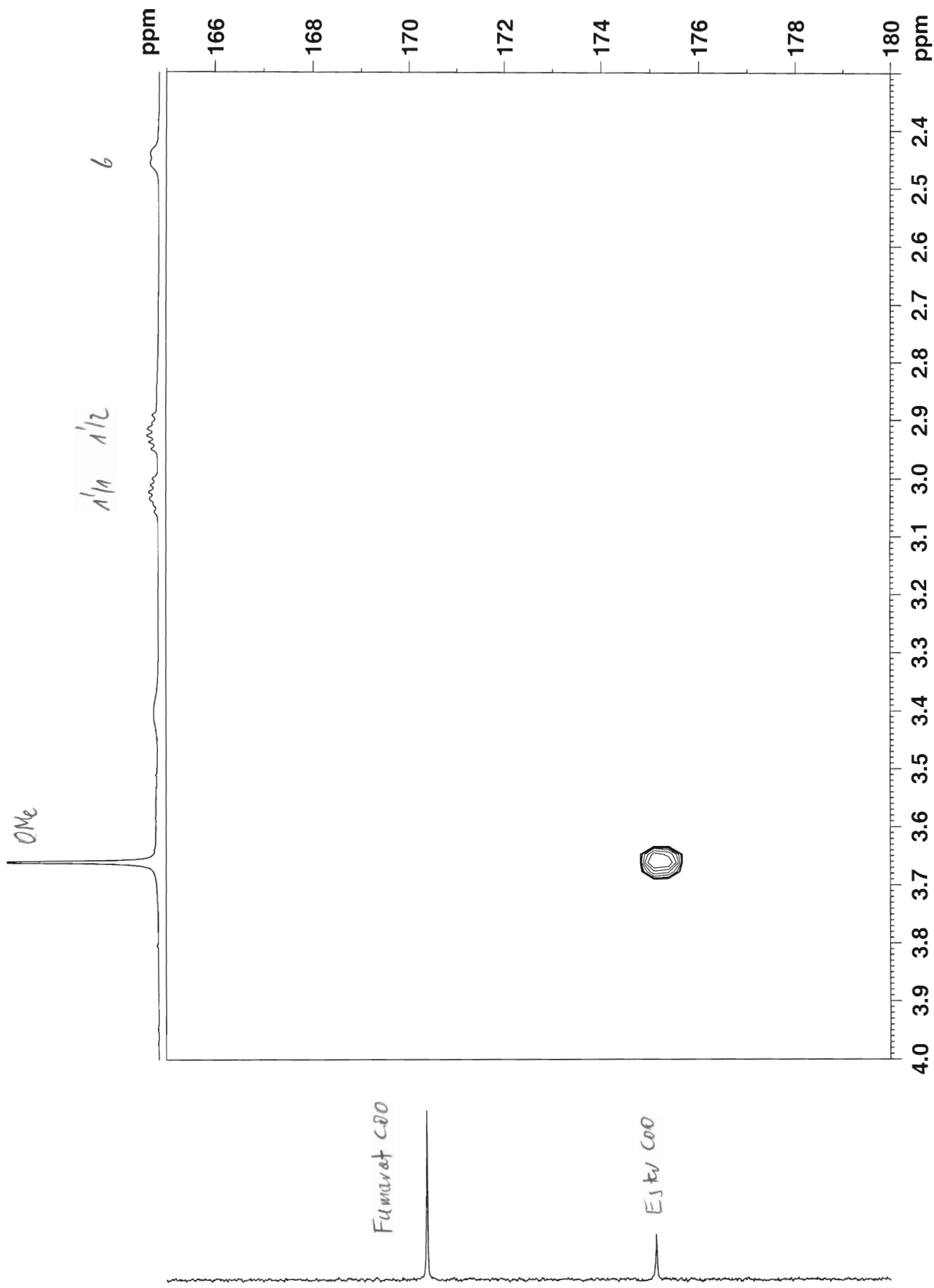




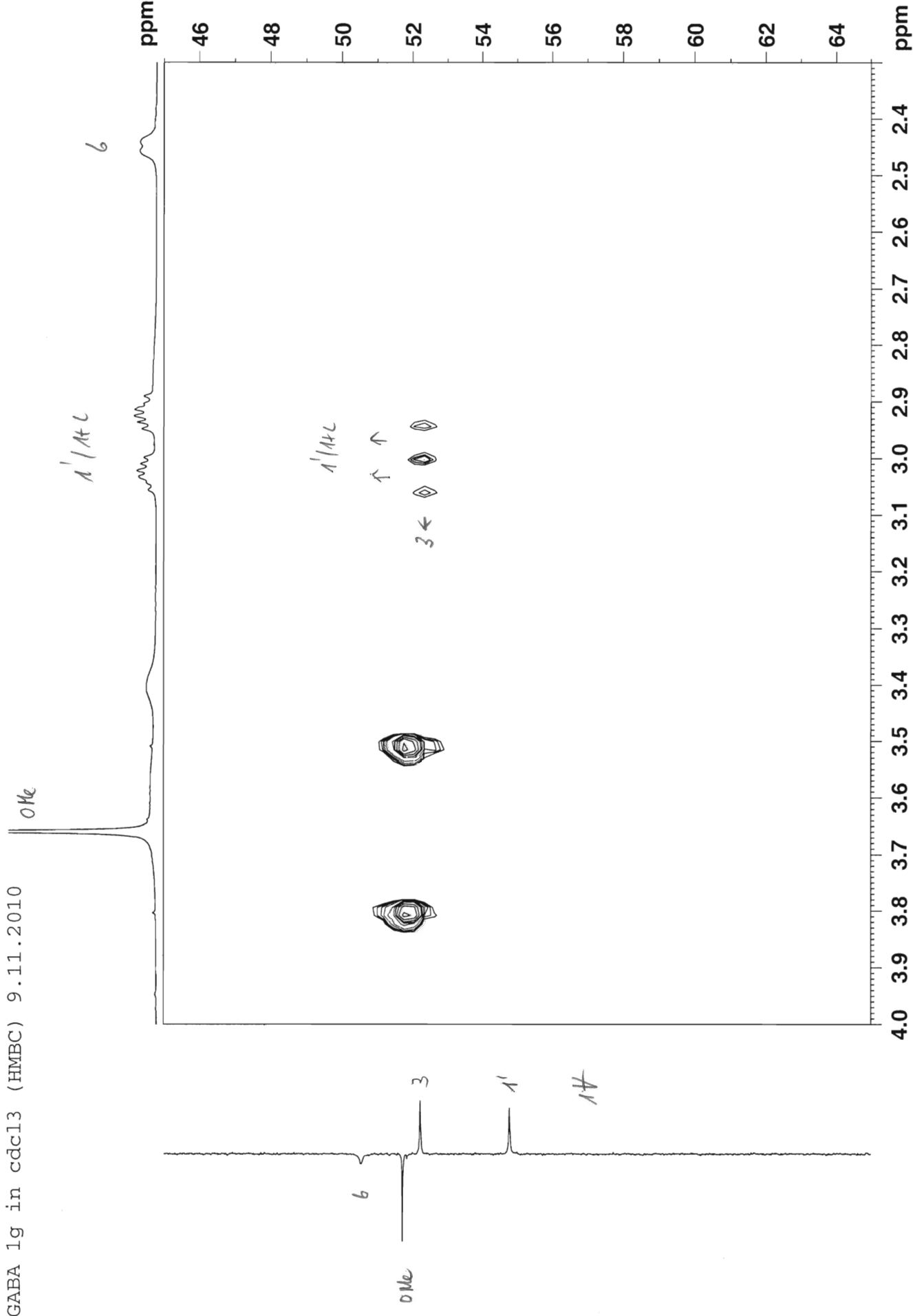
GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



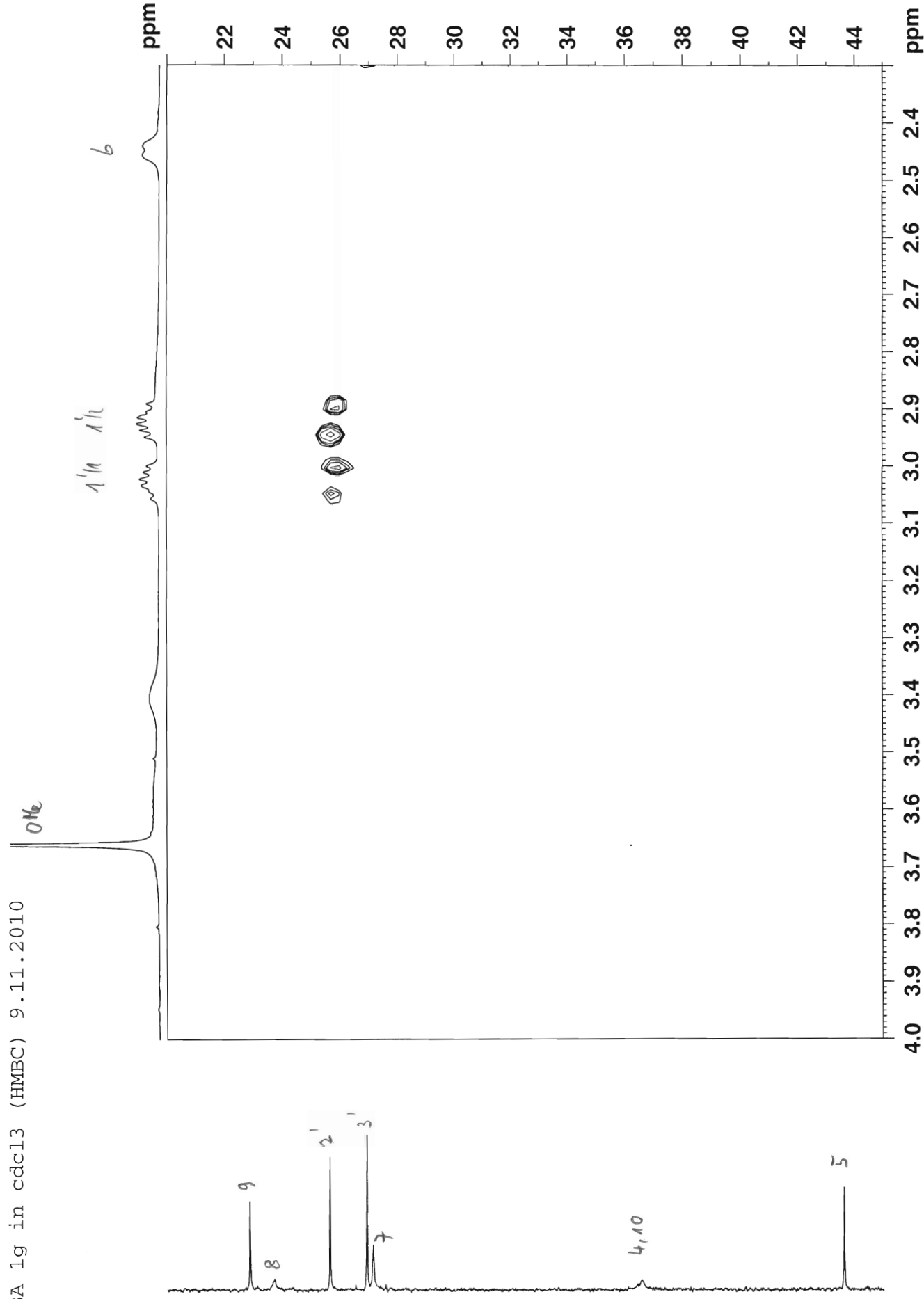
GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



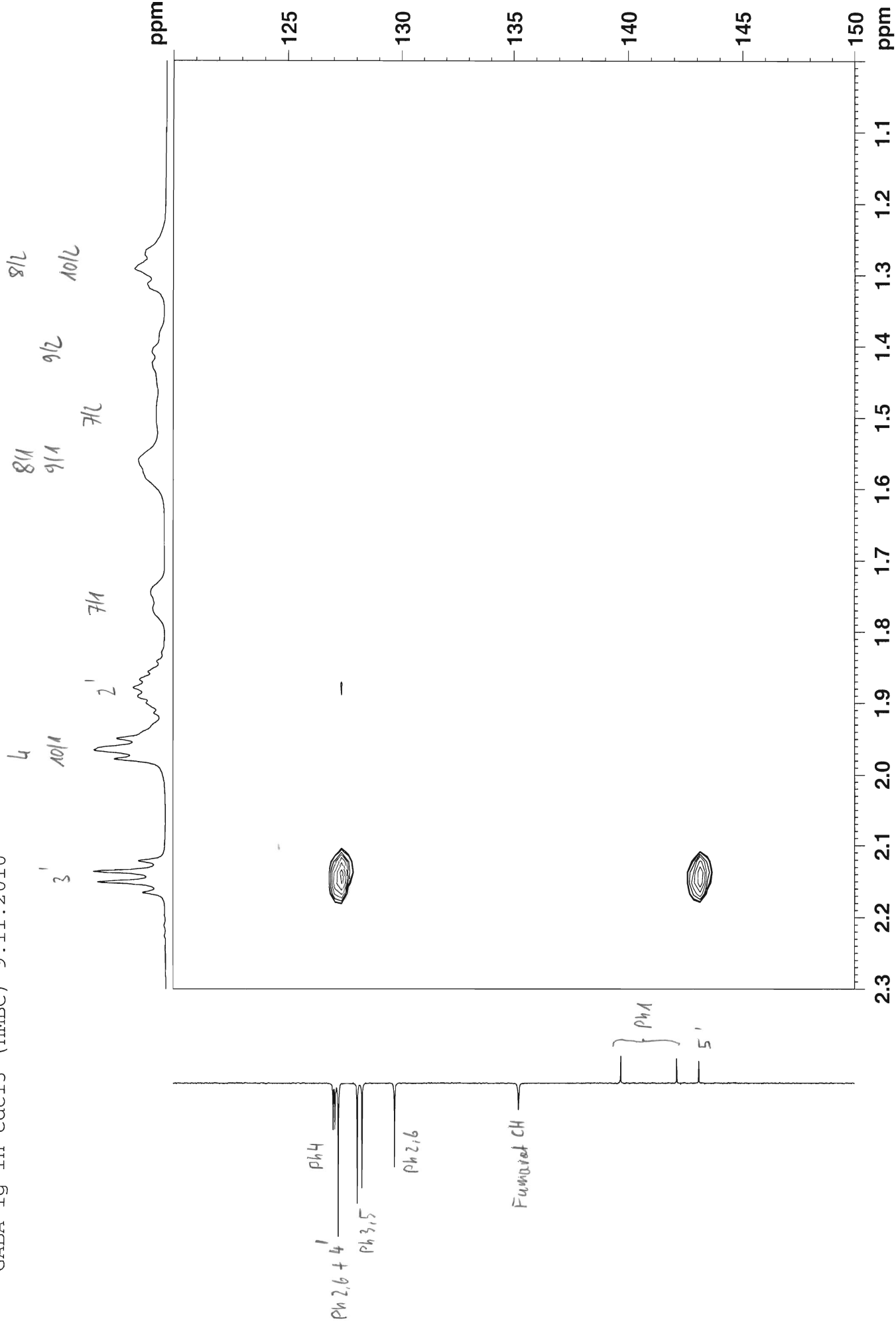
GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

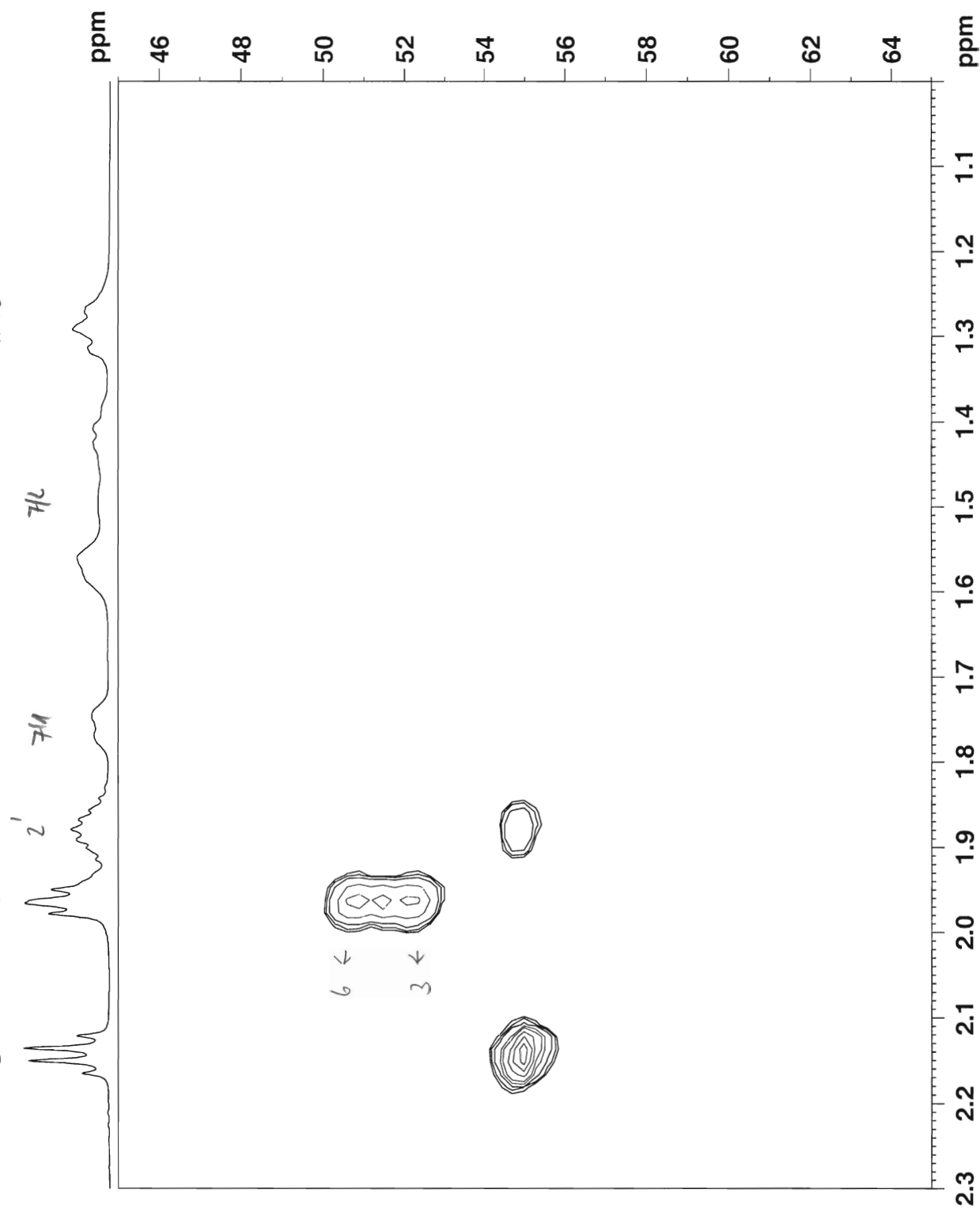


GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010



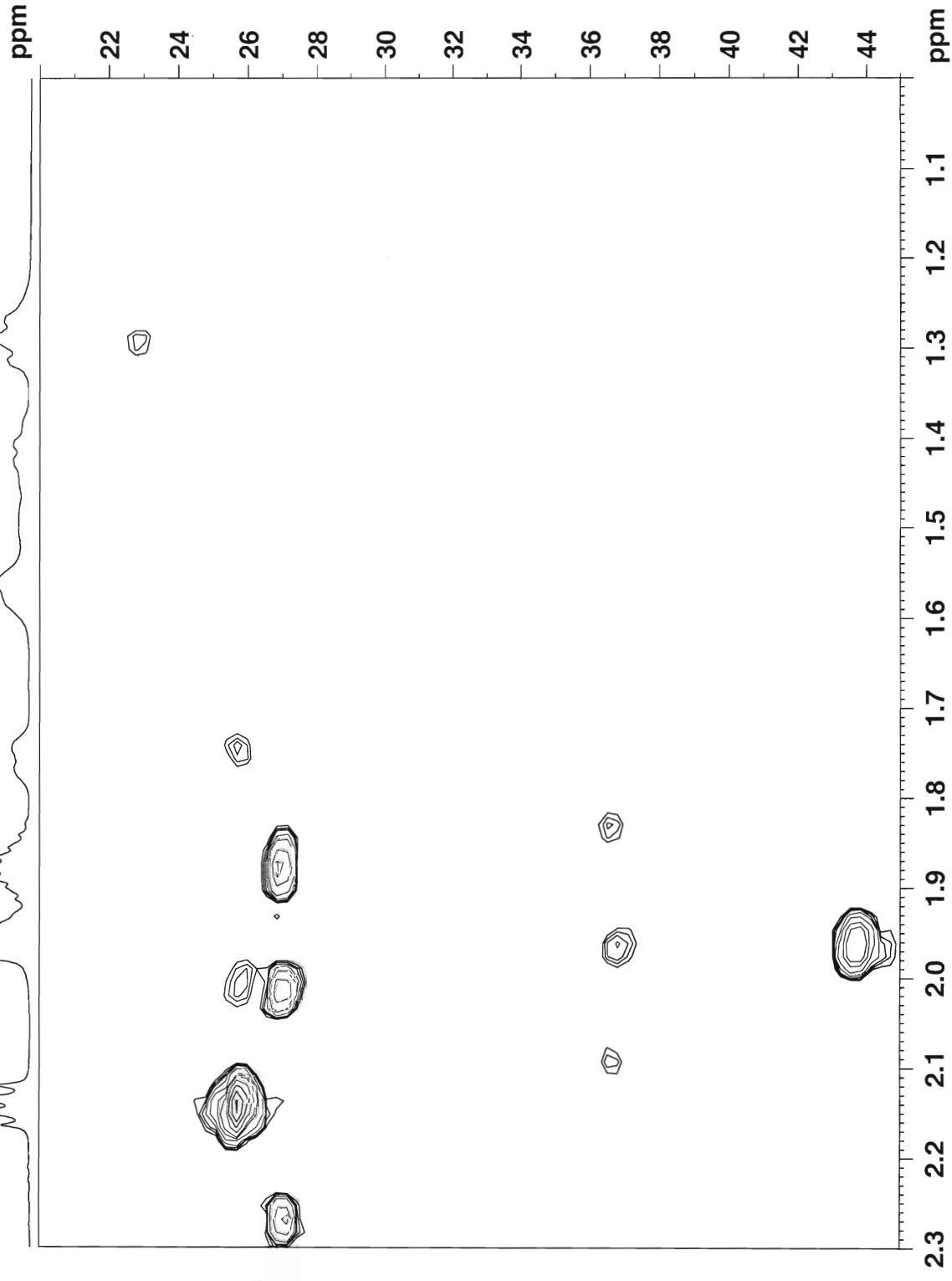
GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

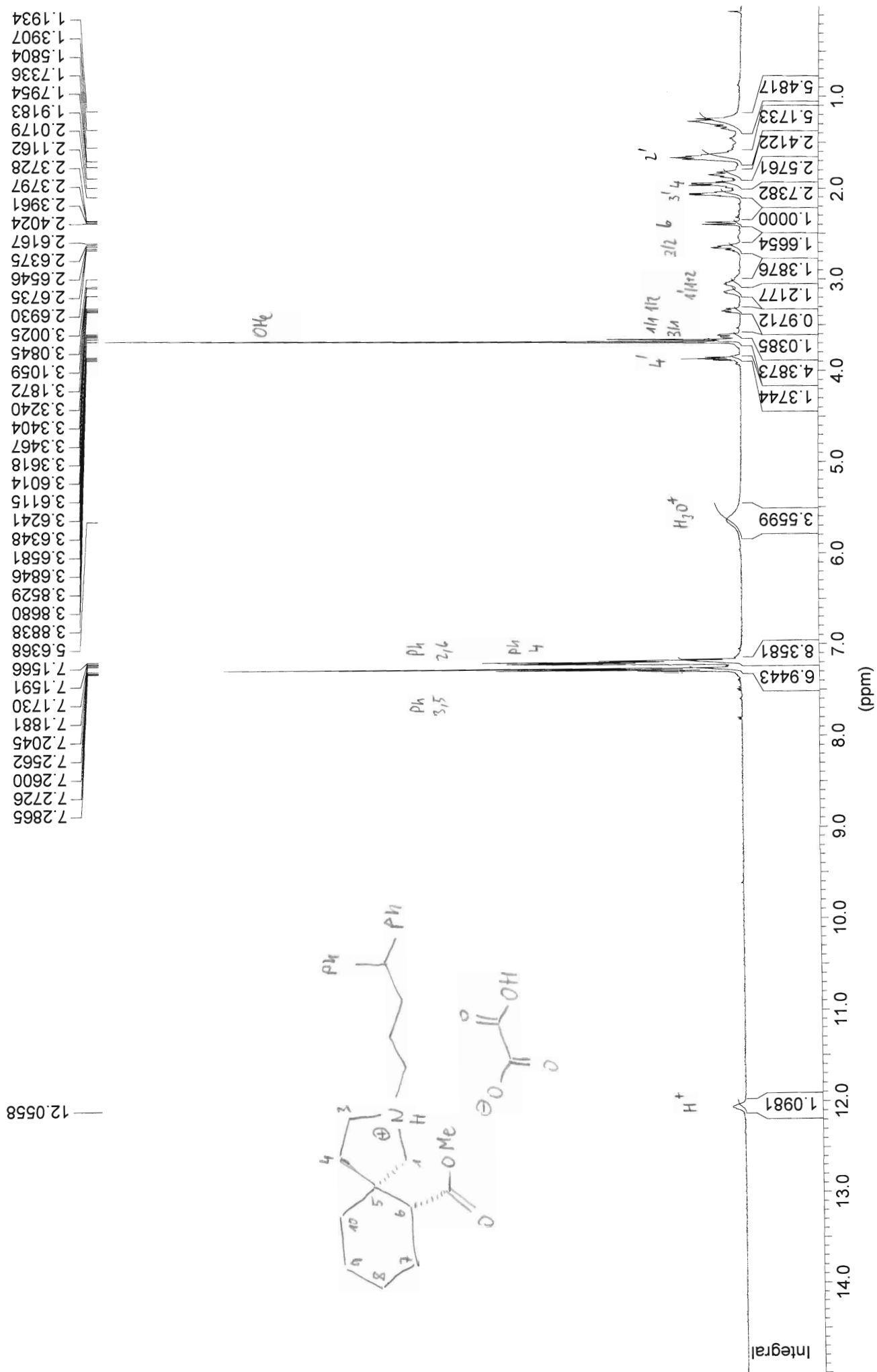
3' 4 8/2 9/2 10/2



GABA 1g in cdcl3 (HMBC) 9.11.2010

3' 4 10/11 7/11 2' 8/11 9/11 10/11 8/12





7.2865
7.2726
7.2600
7.2562
7.2045
7.1881
7.1730
7.1591
7.1566

5.6368

CHCl₃

Ph
3.5

Ph
2.6

Ph
4

Ph
4

H₂O⁺

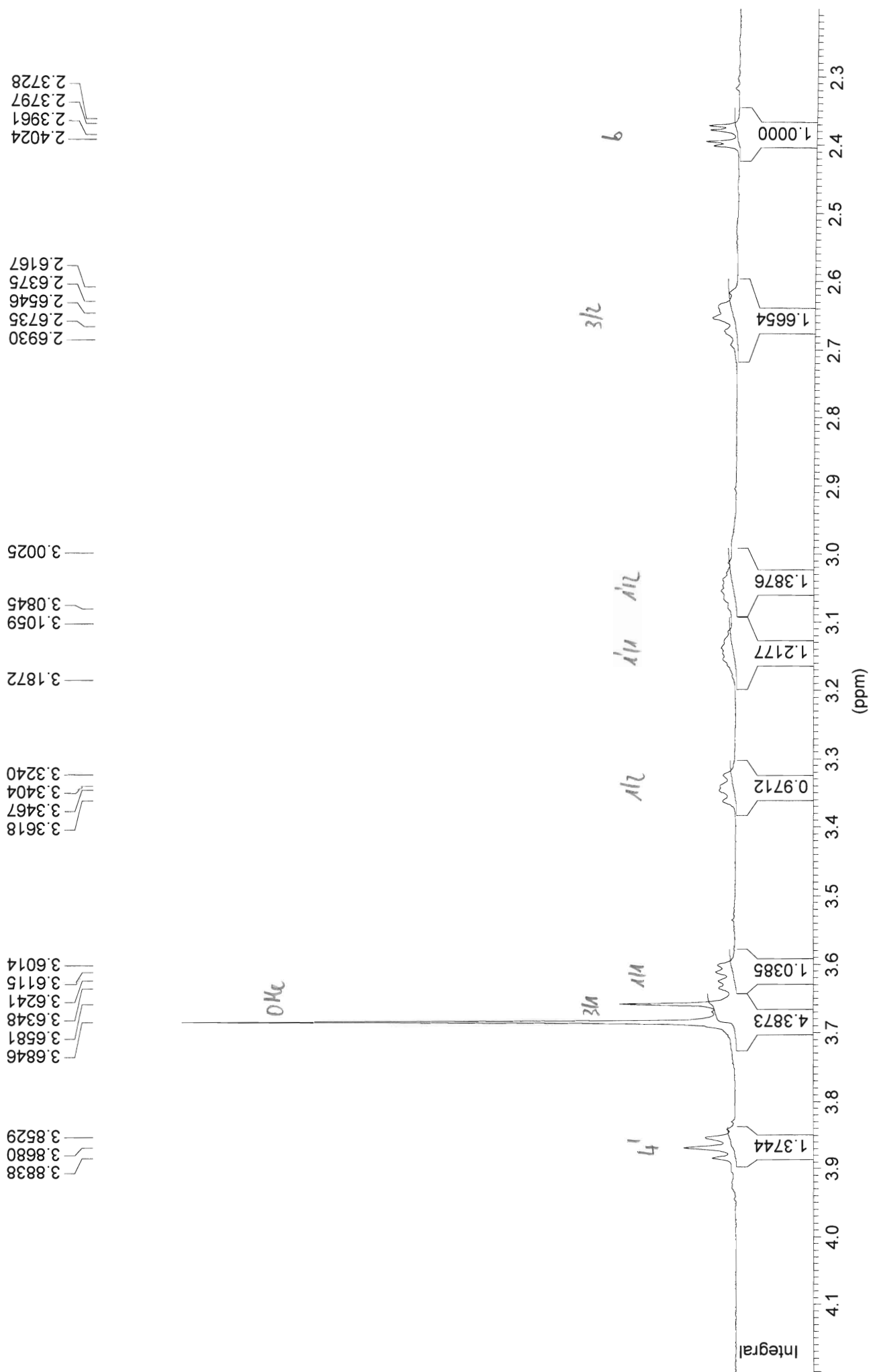
Integral

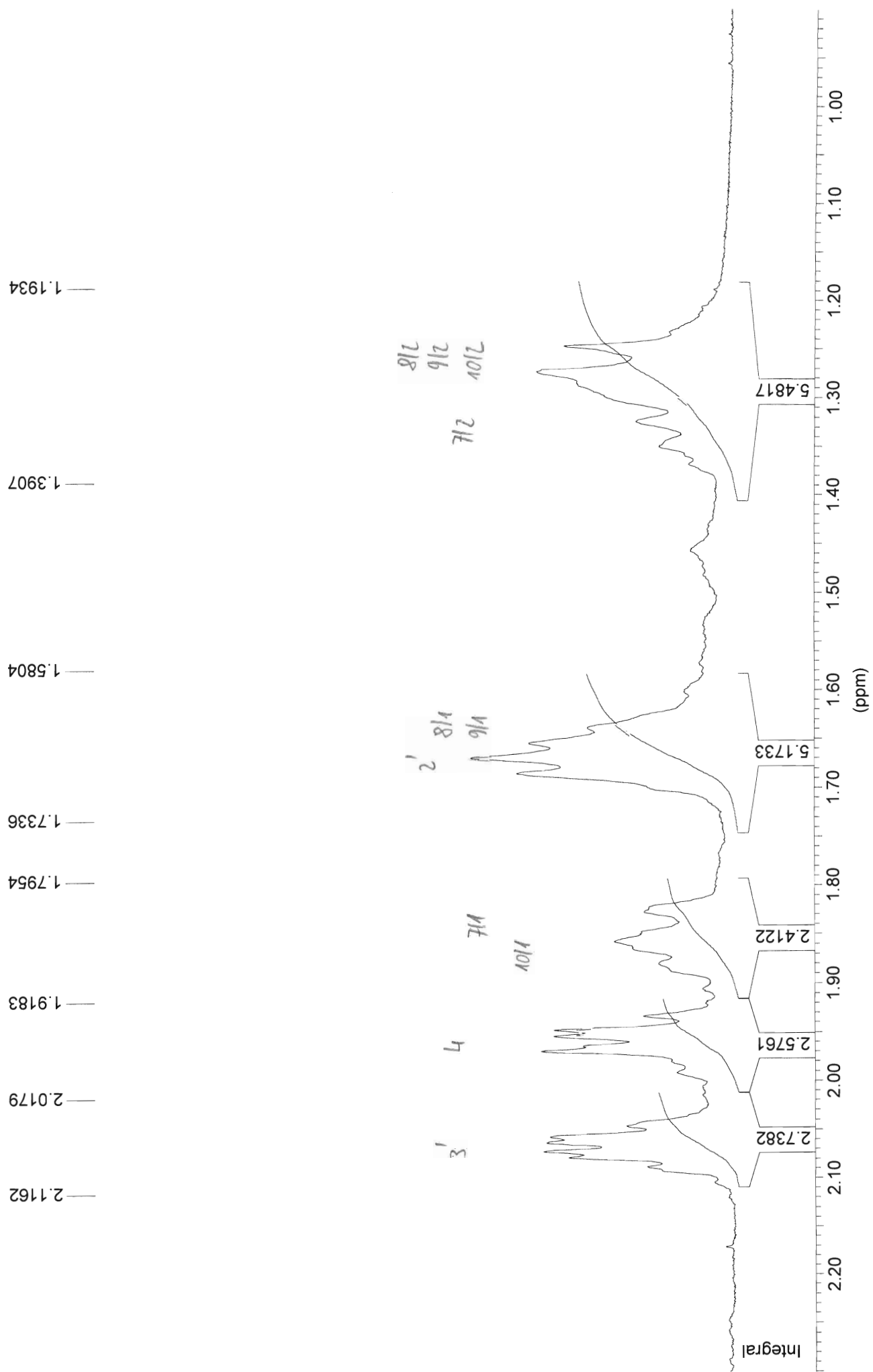
6.9443

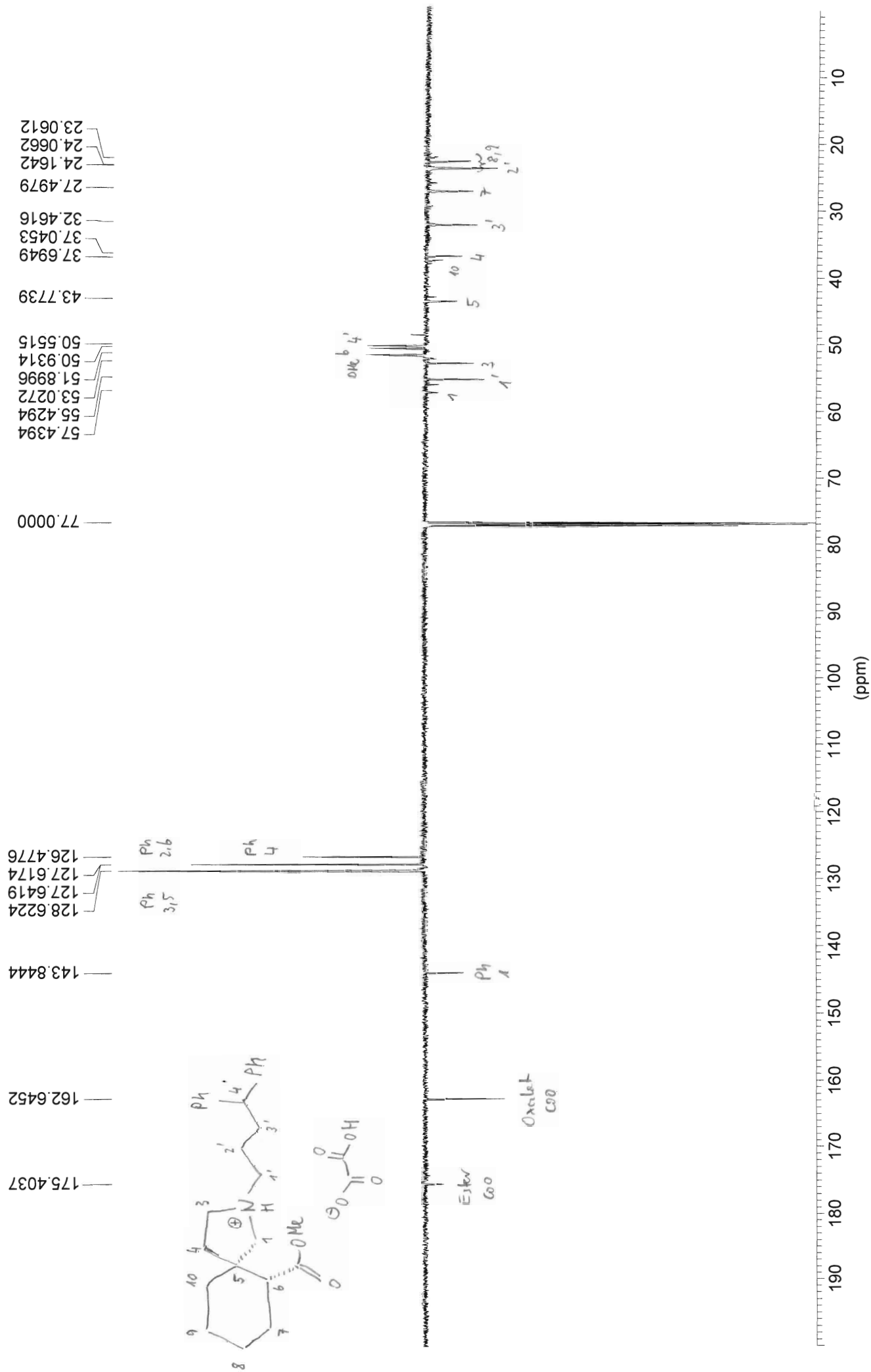
8.3581

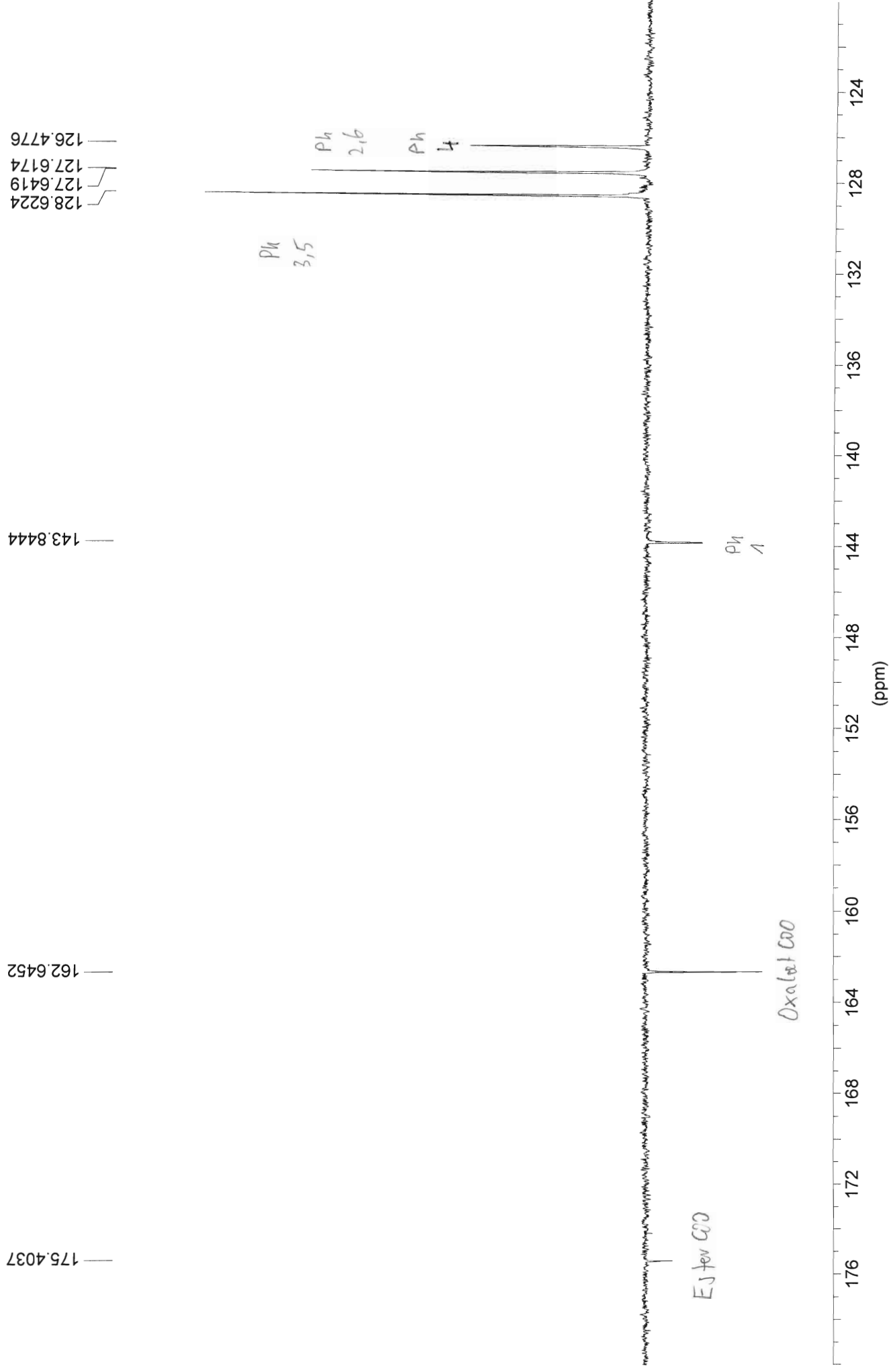
3.5599

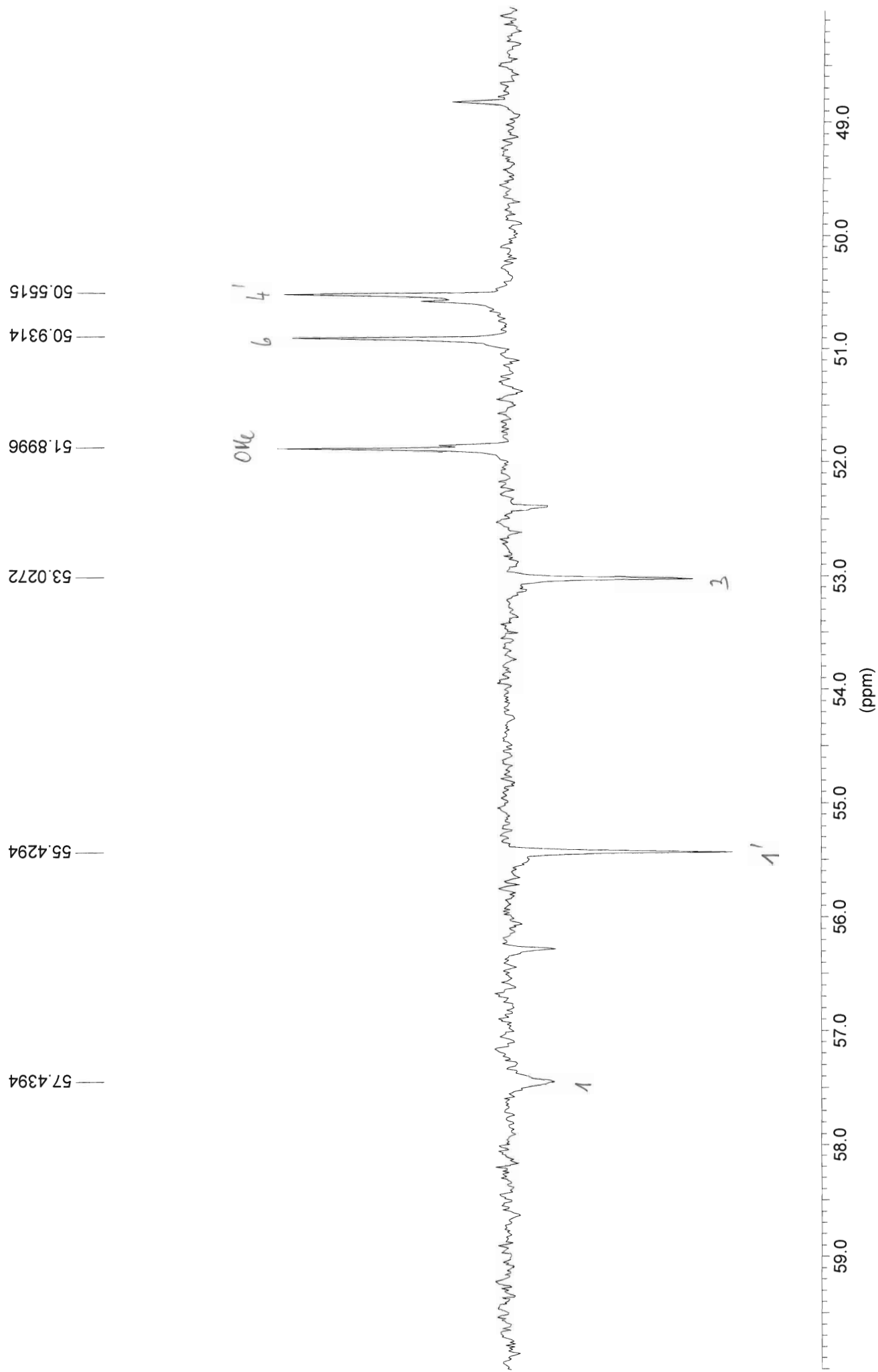
(ppm)

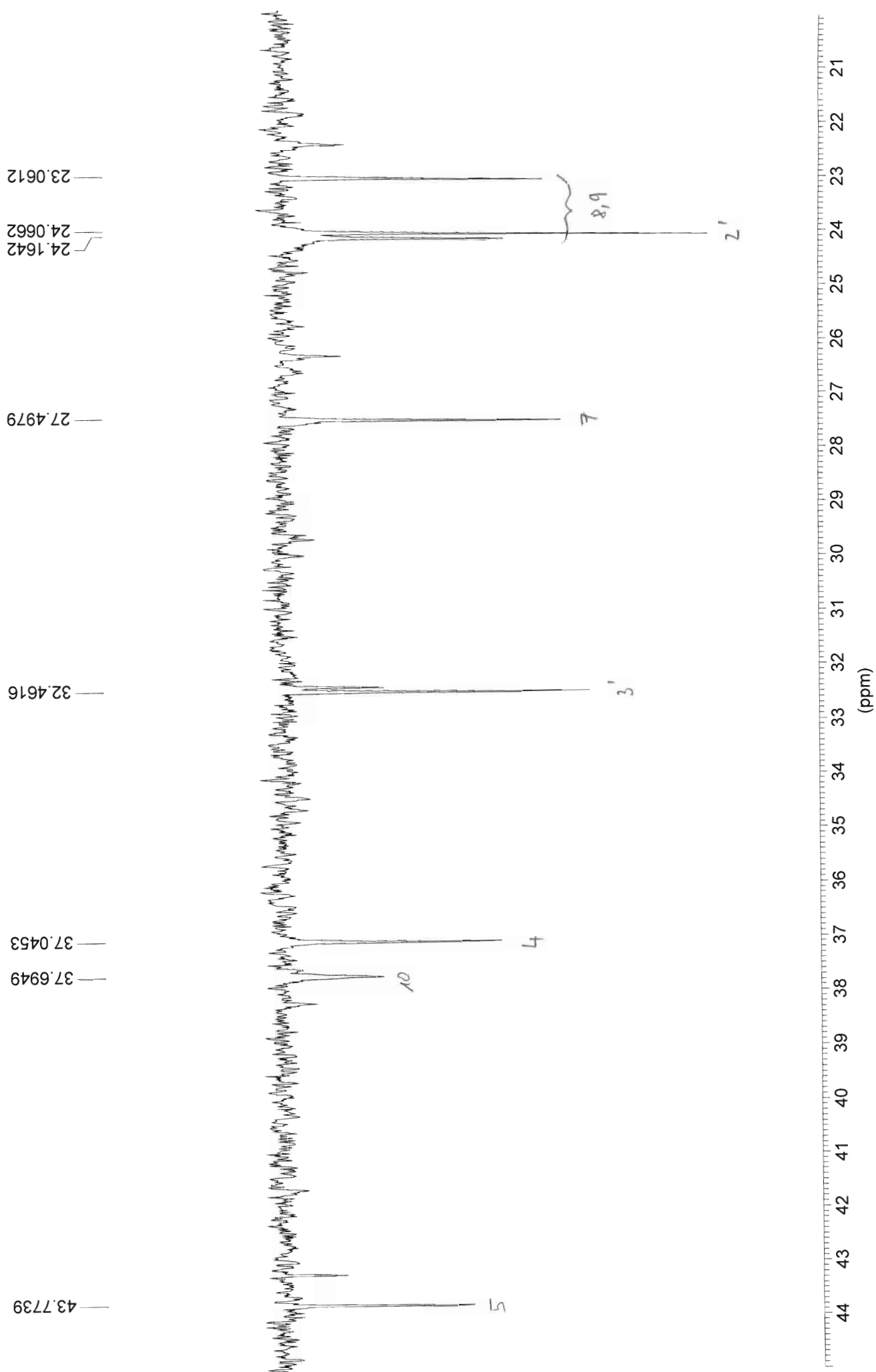




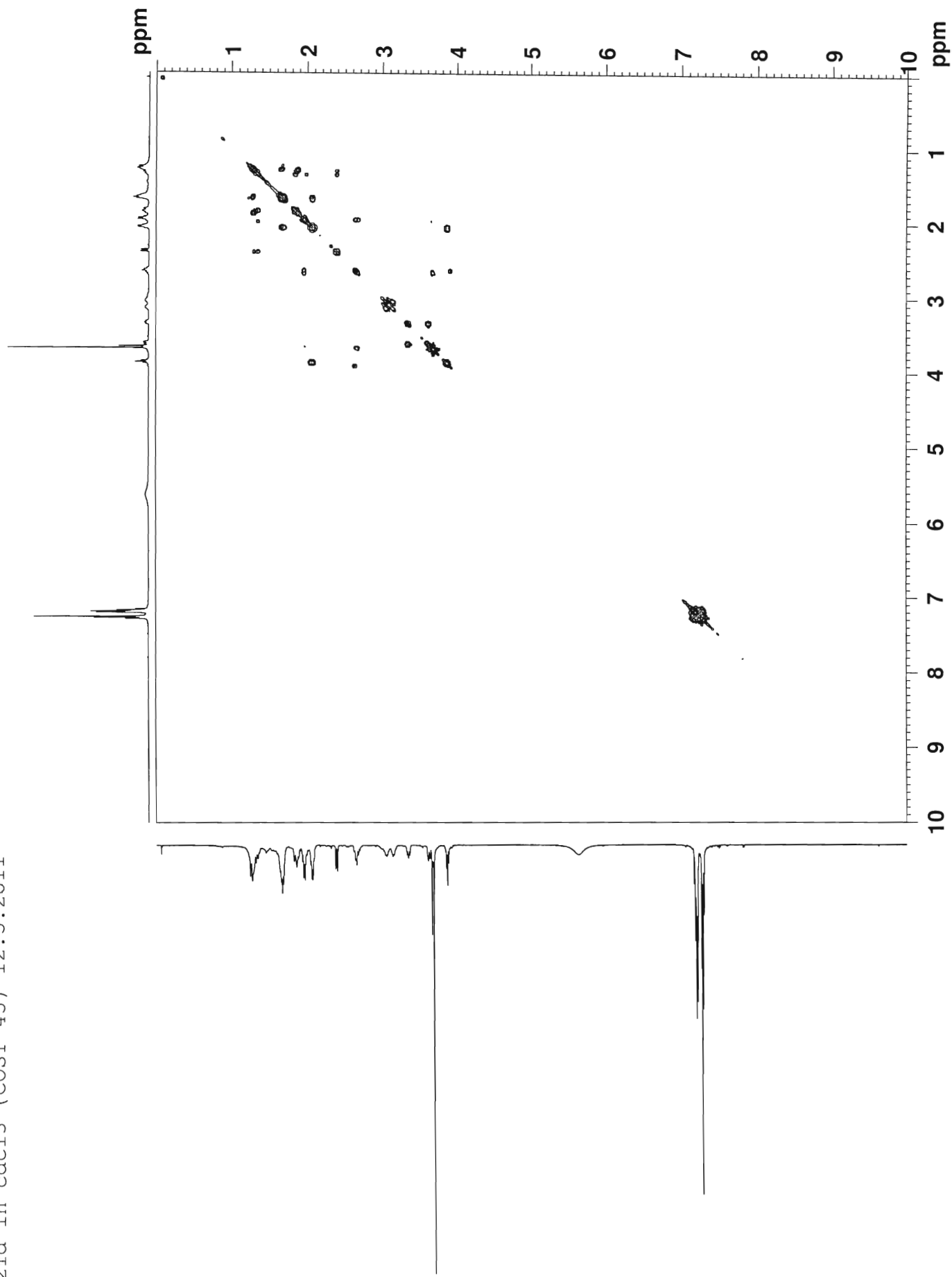


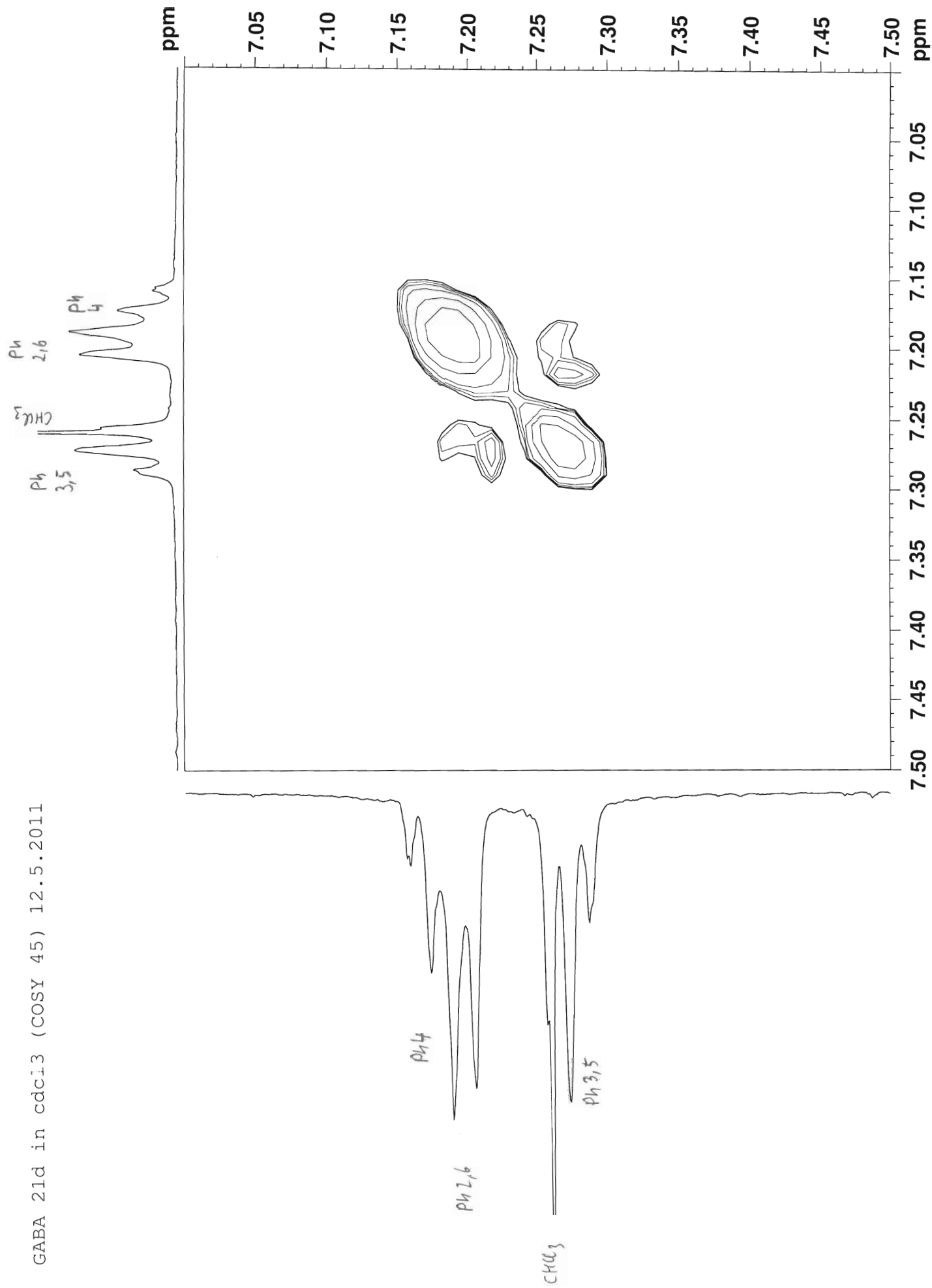


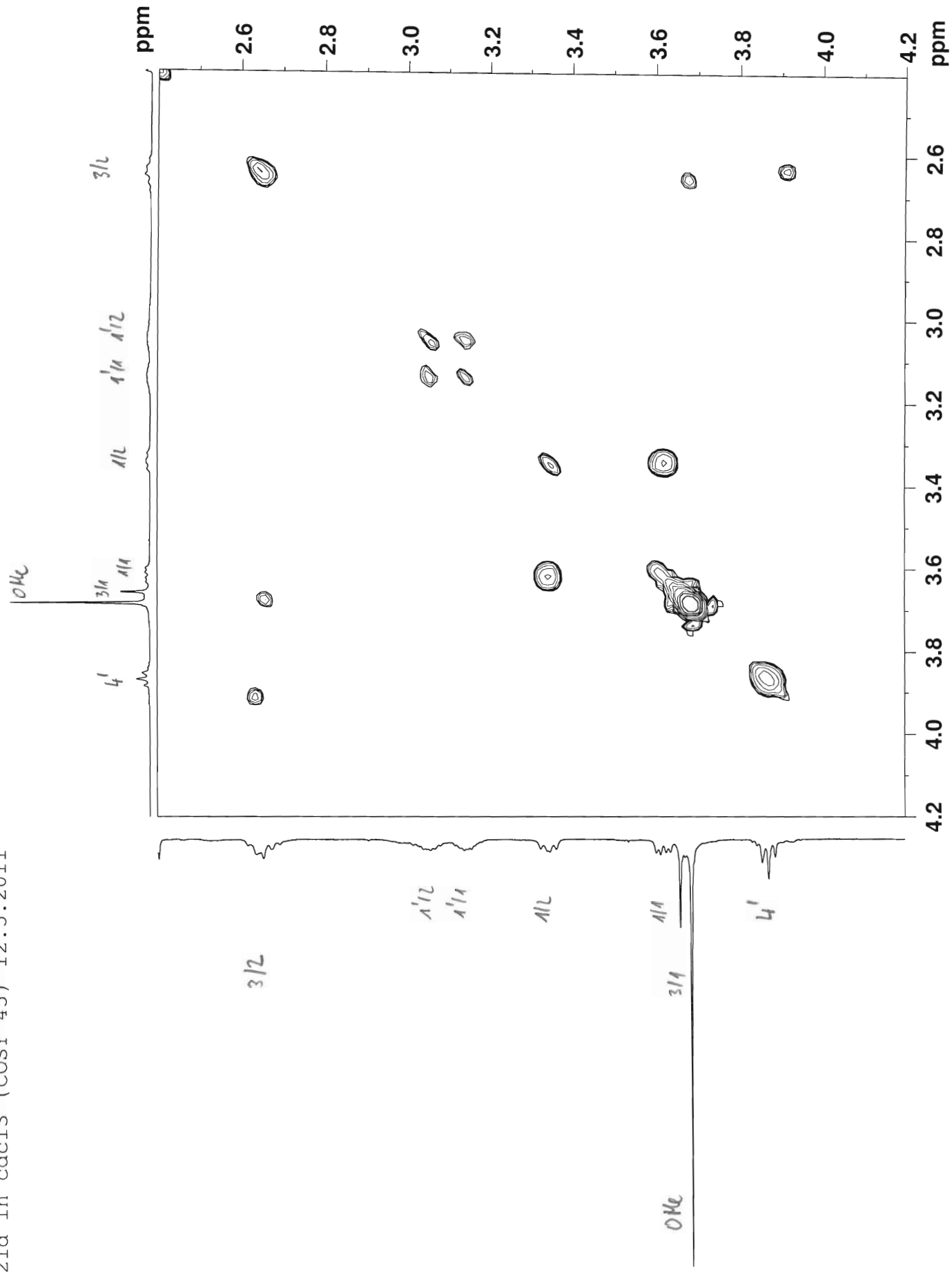


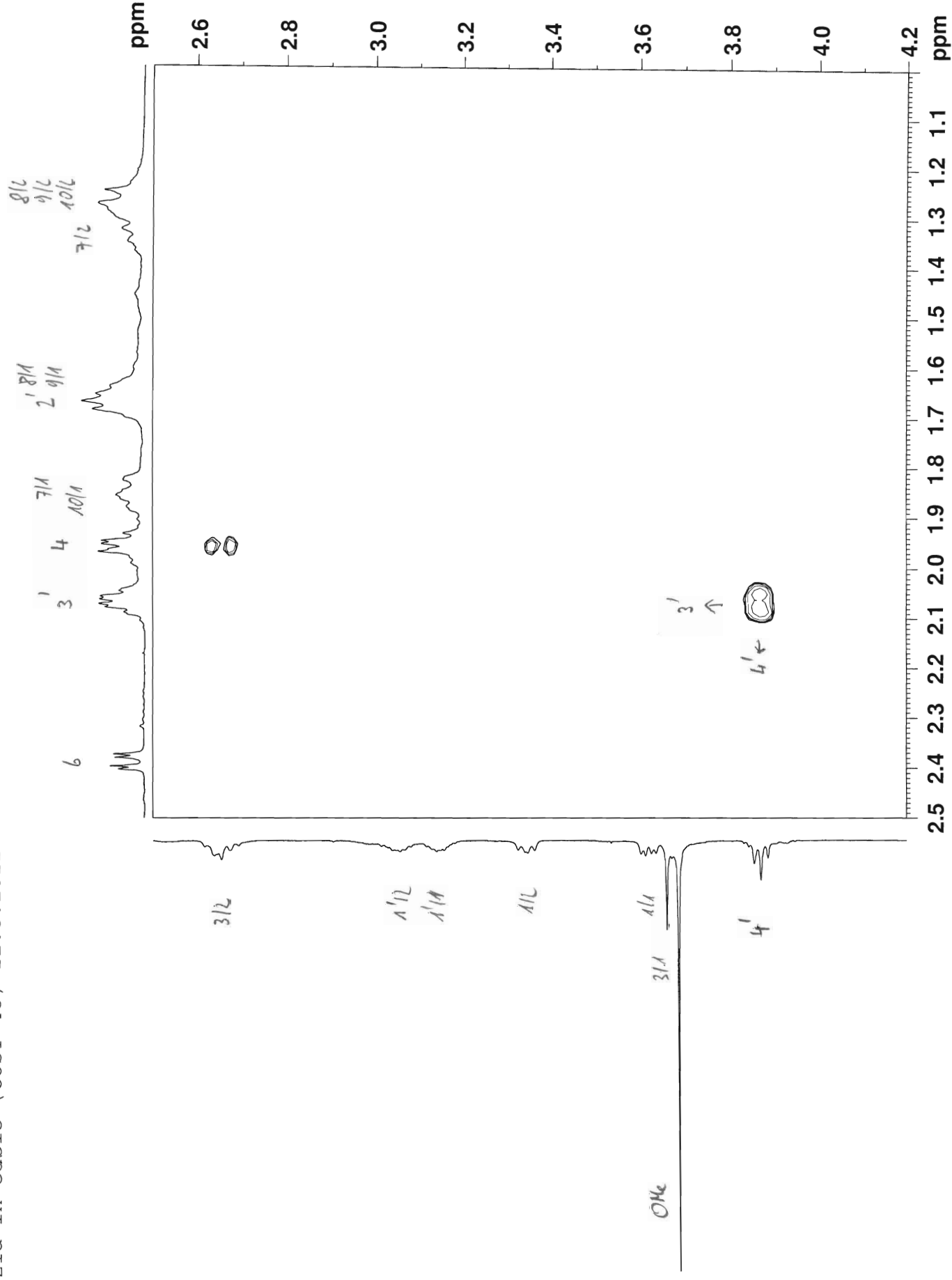


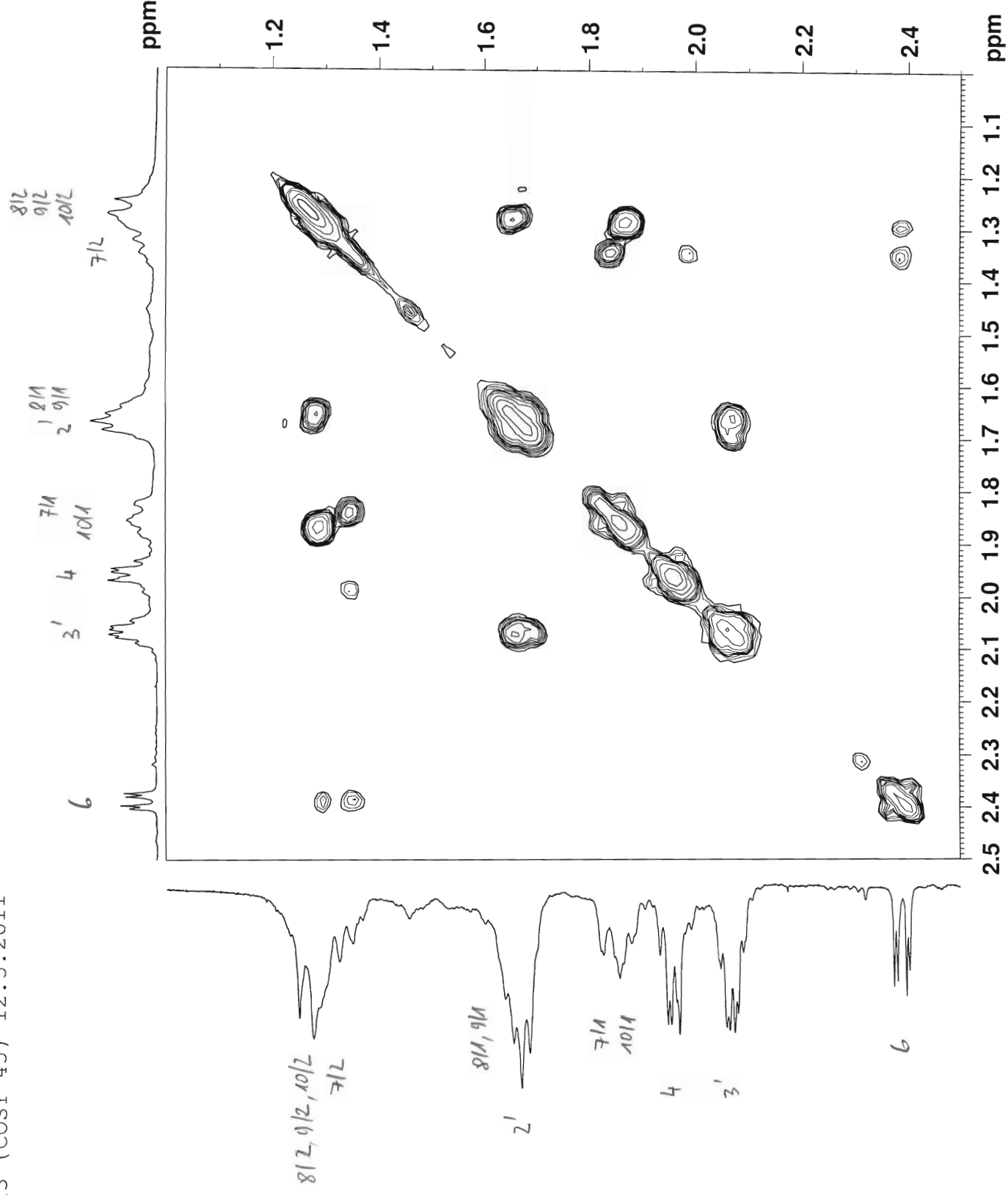
GABA 21d in cdcl3 (COSY 45) 12.5.2011



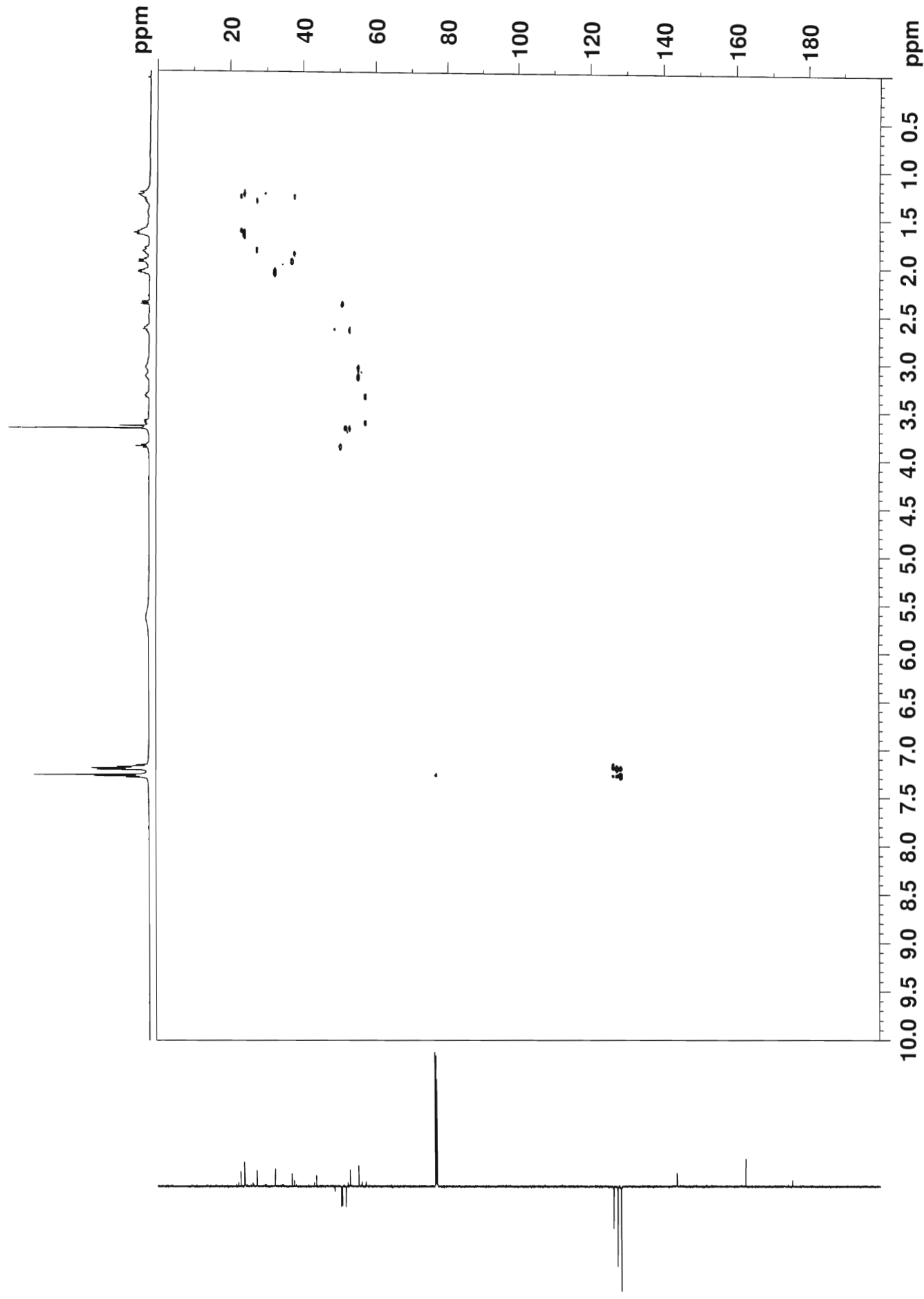


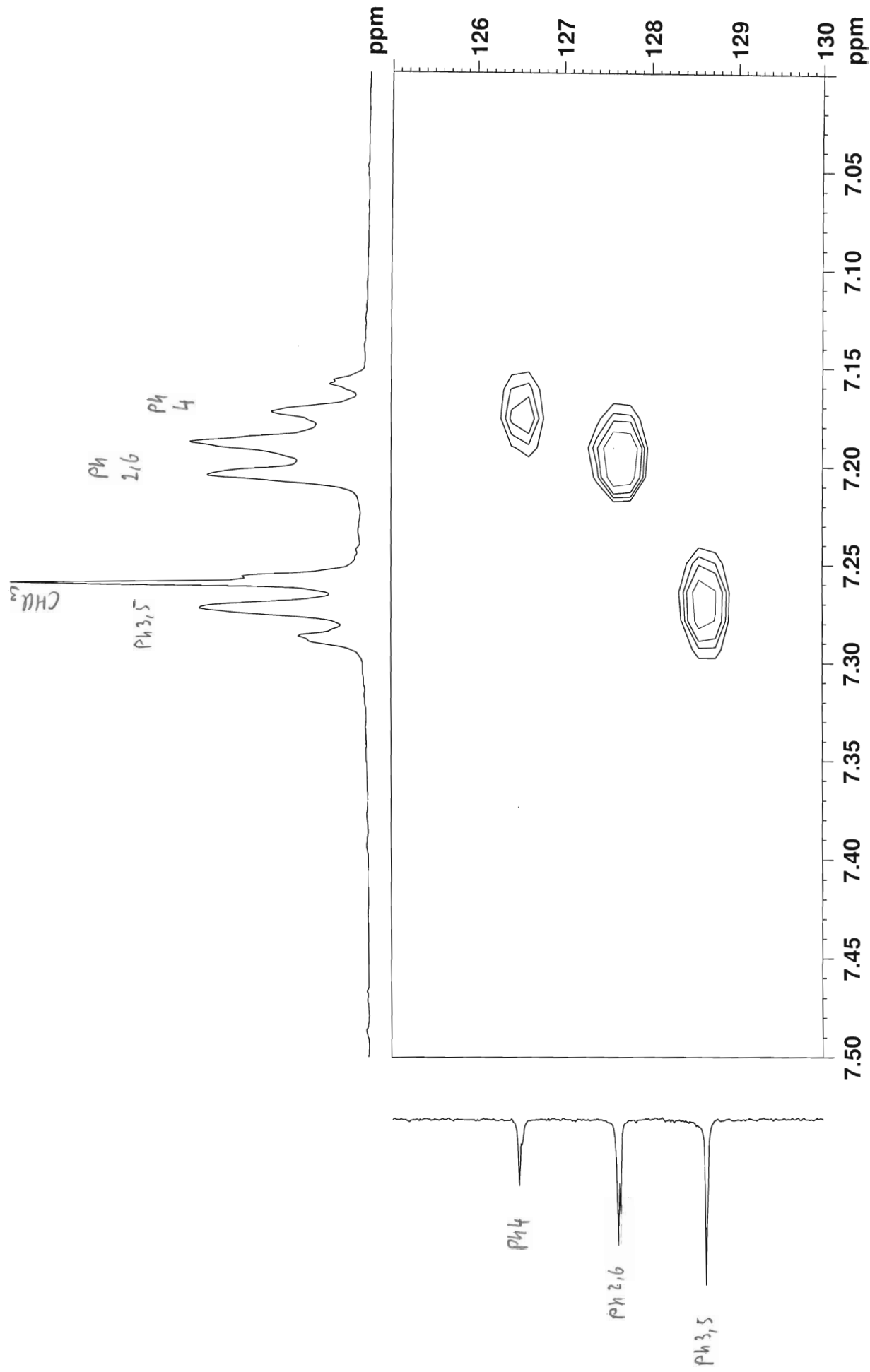


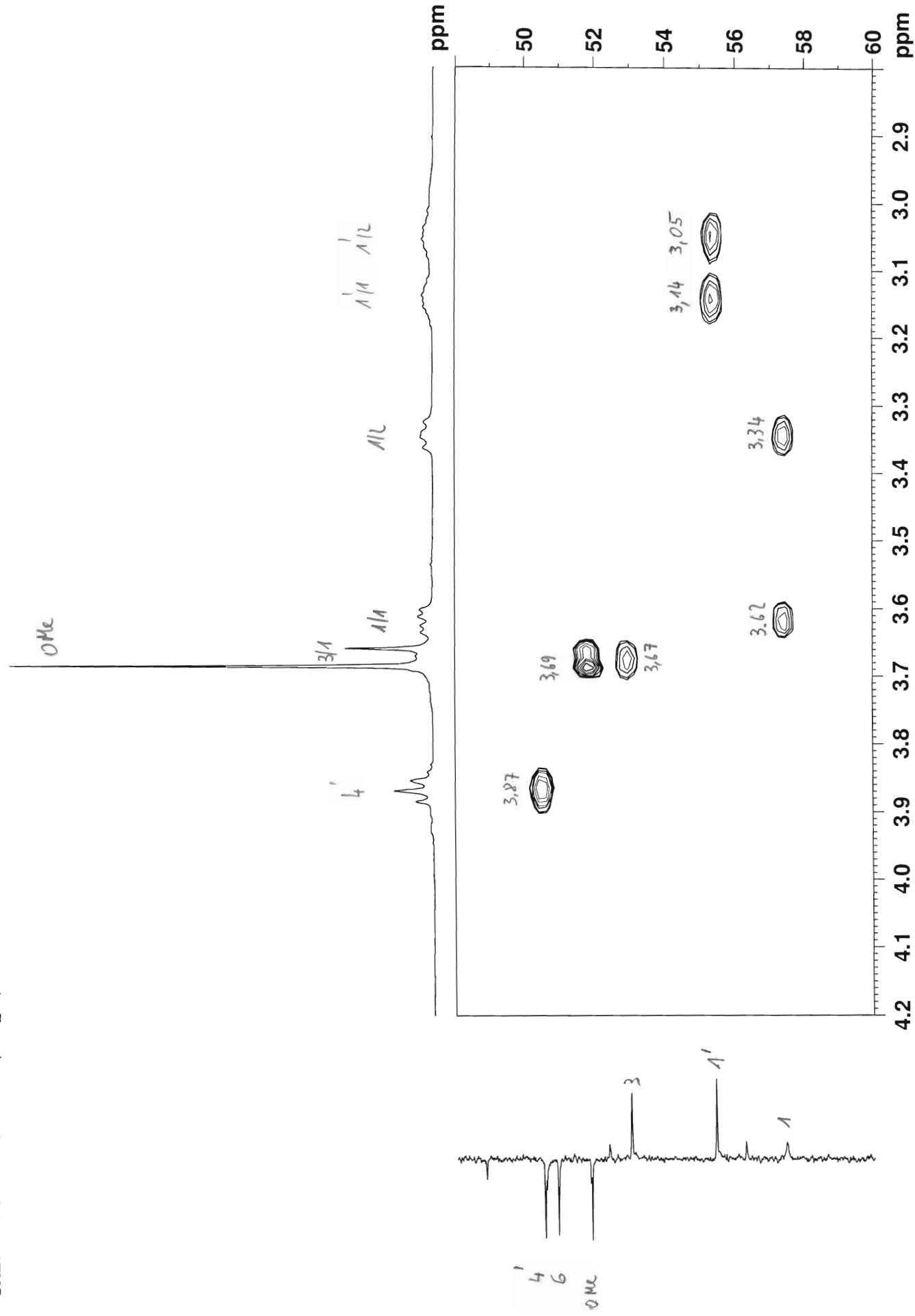


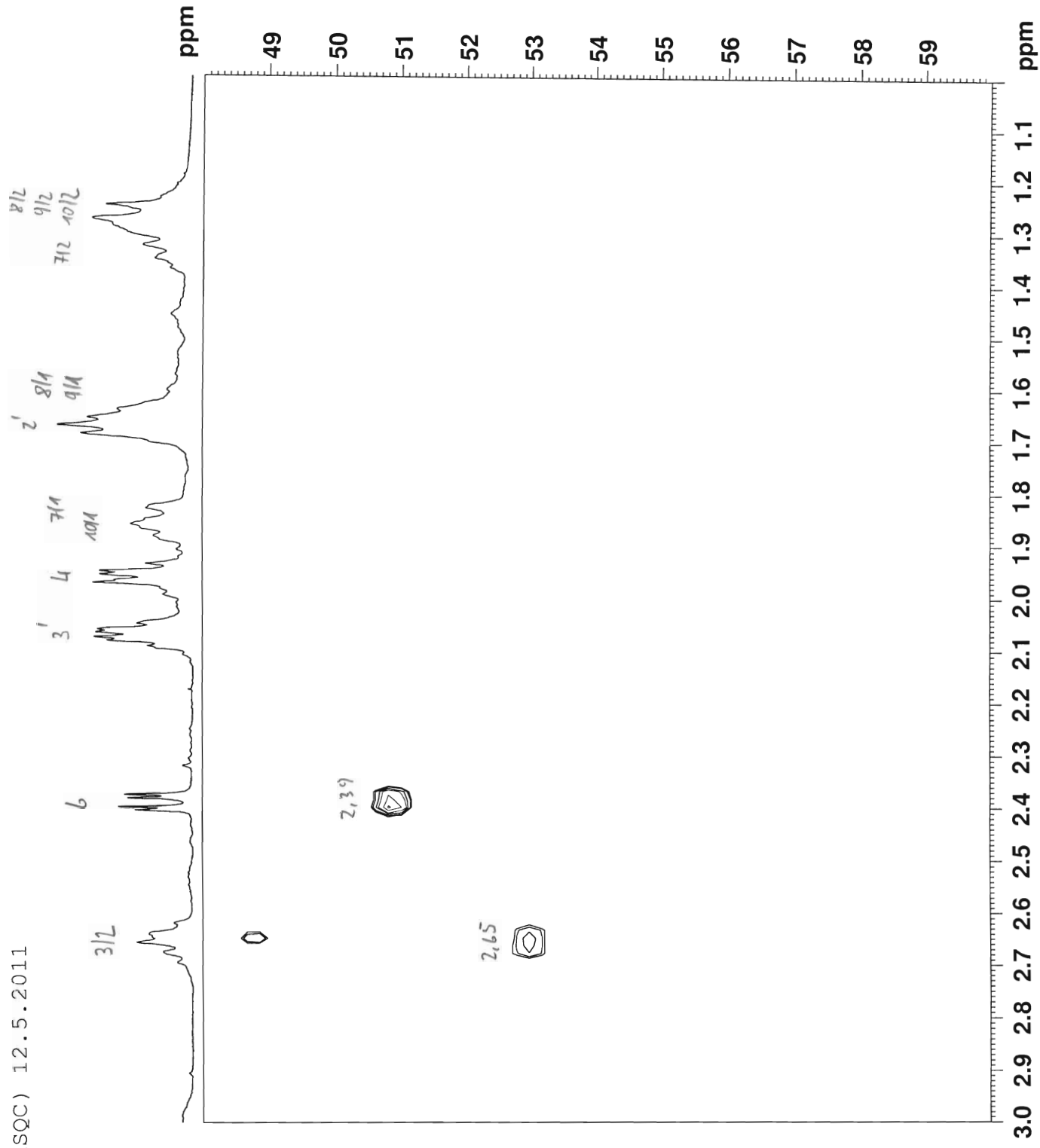


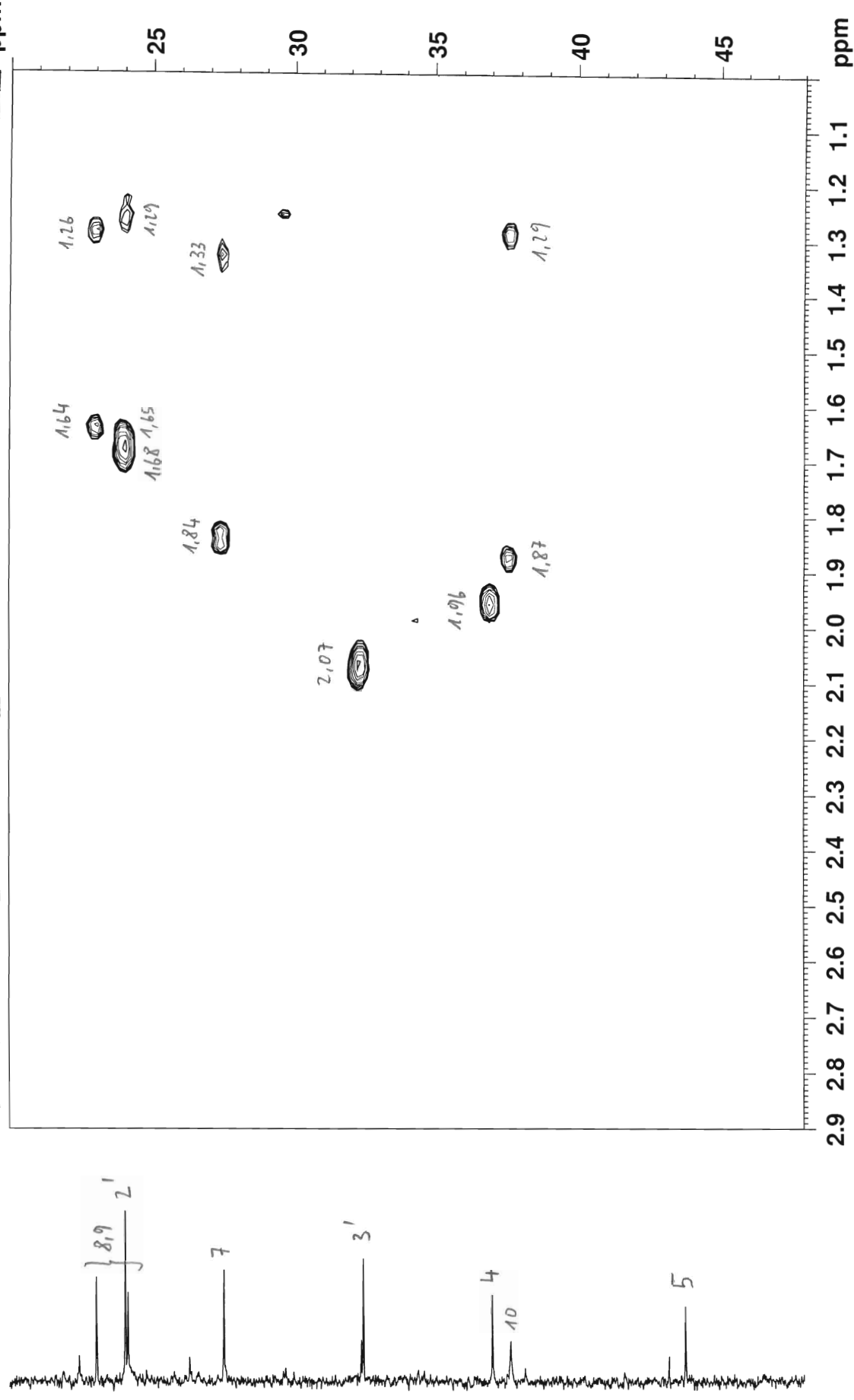
GABA 21d in cdcl3 (HSQC) 12.5.2011



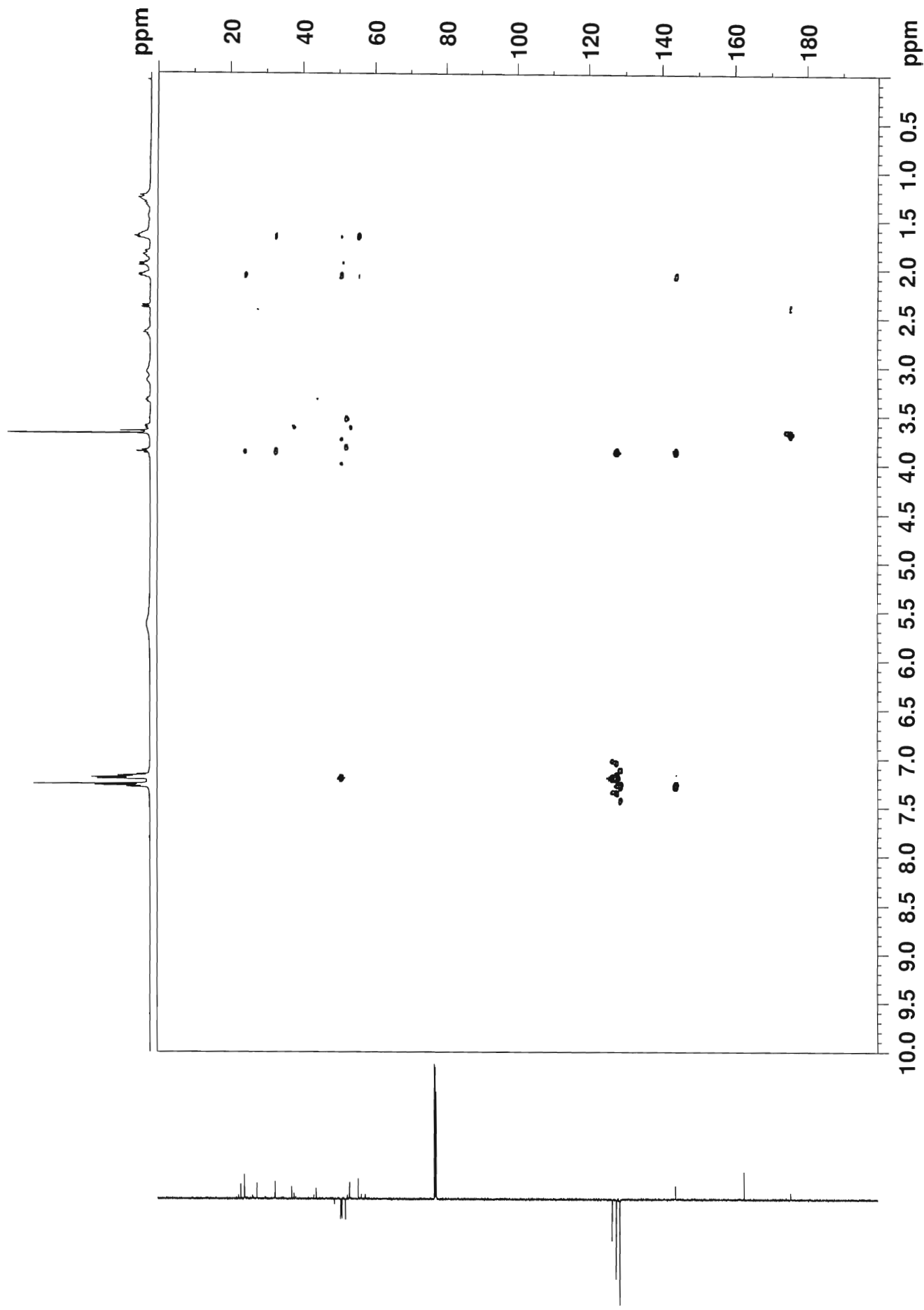


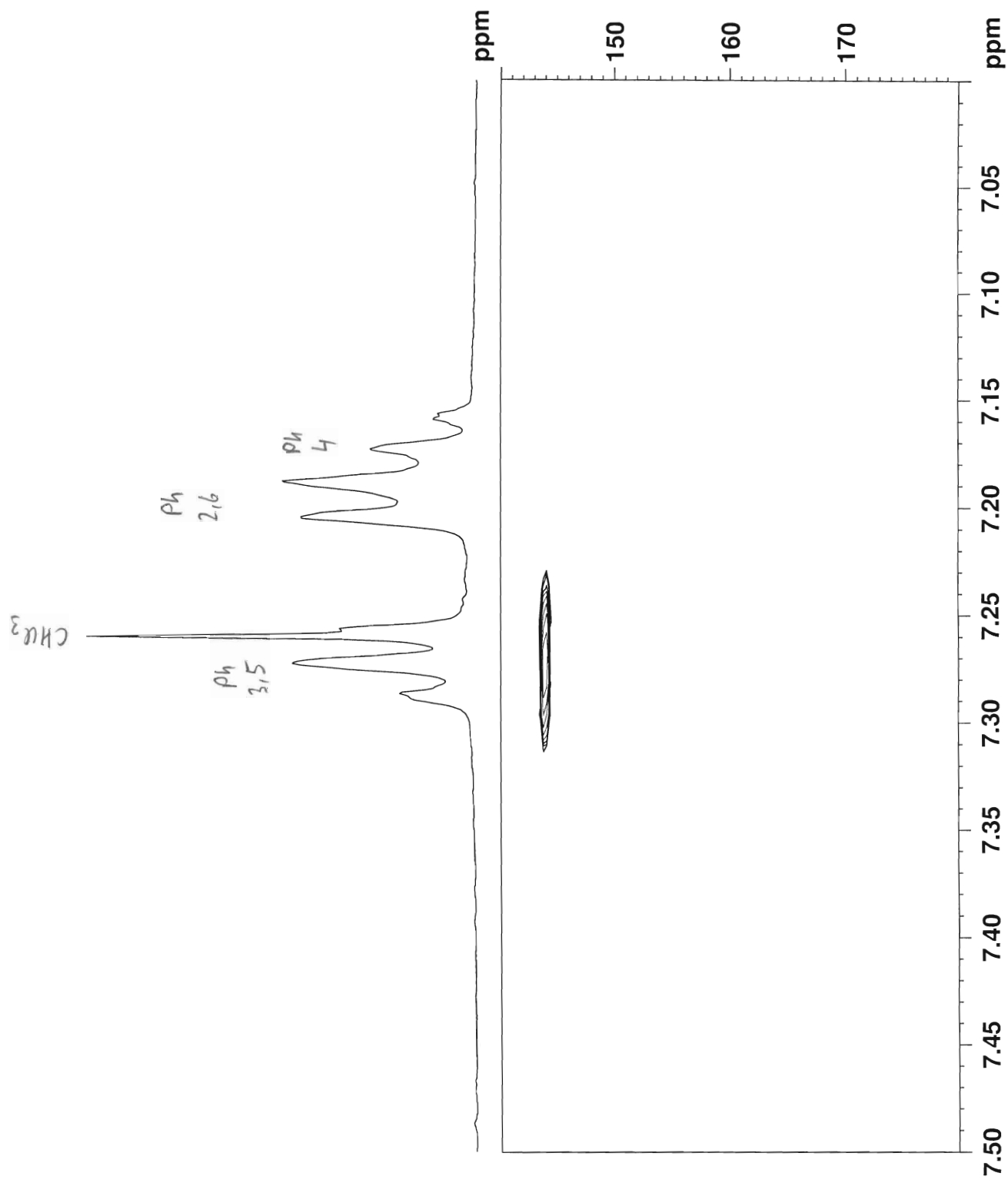


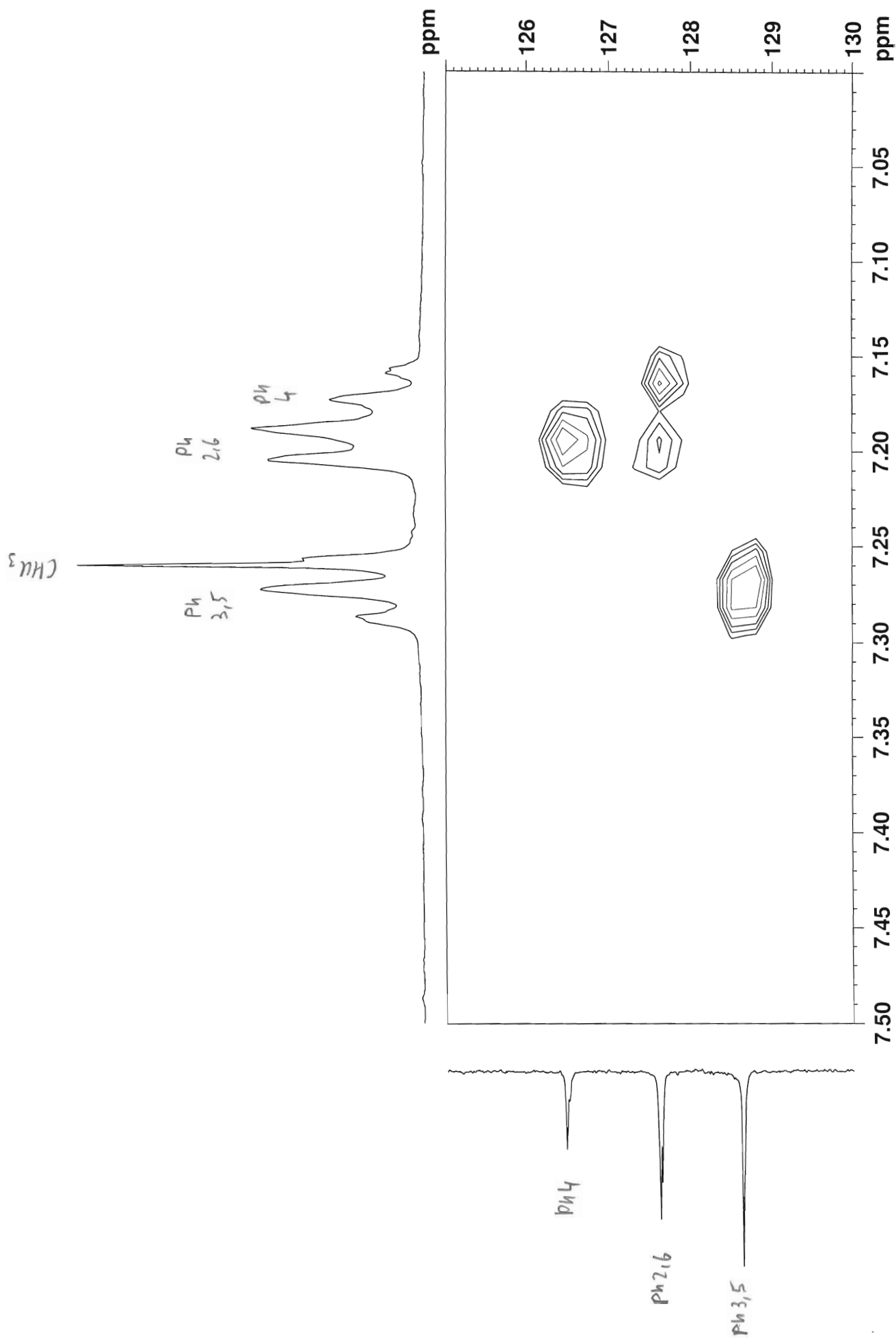


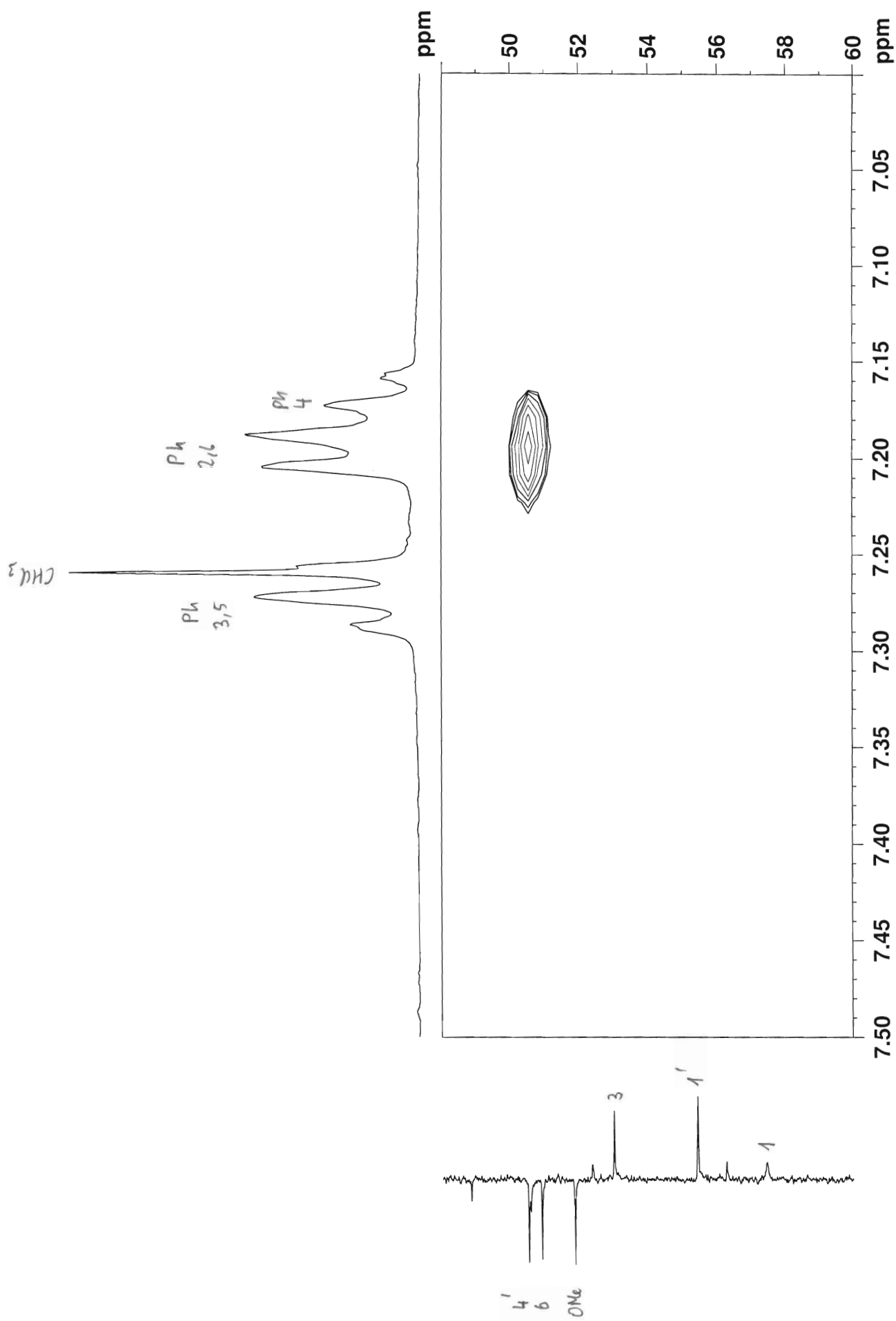


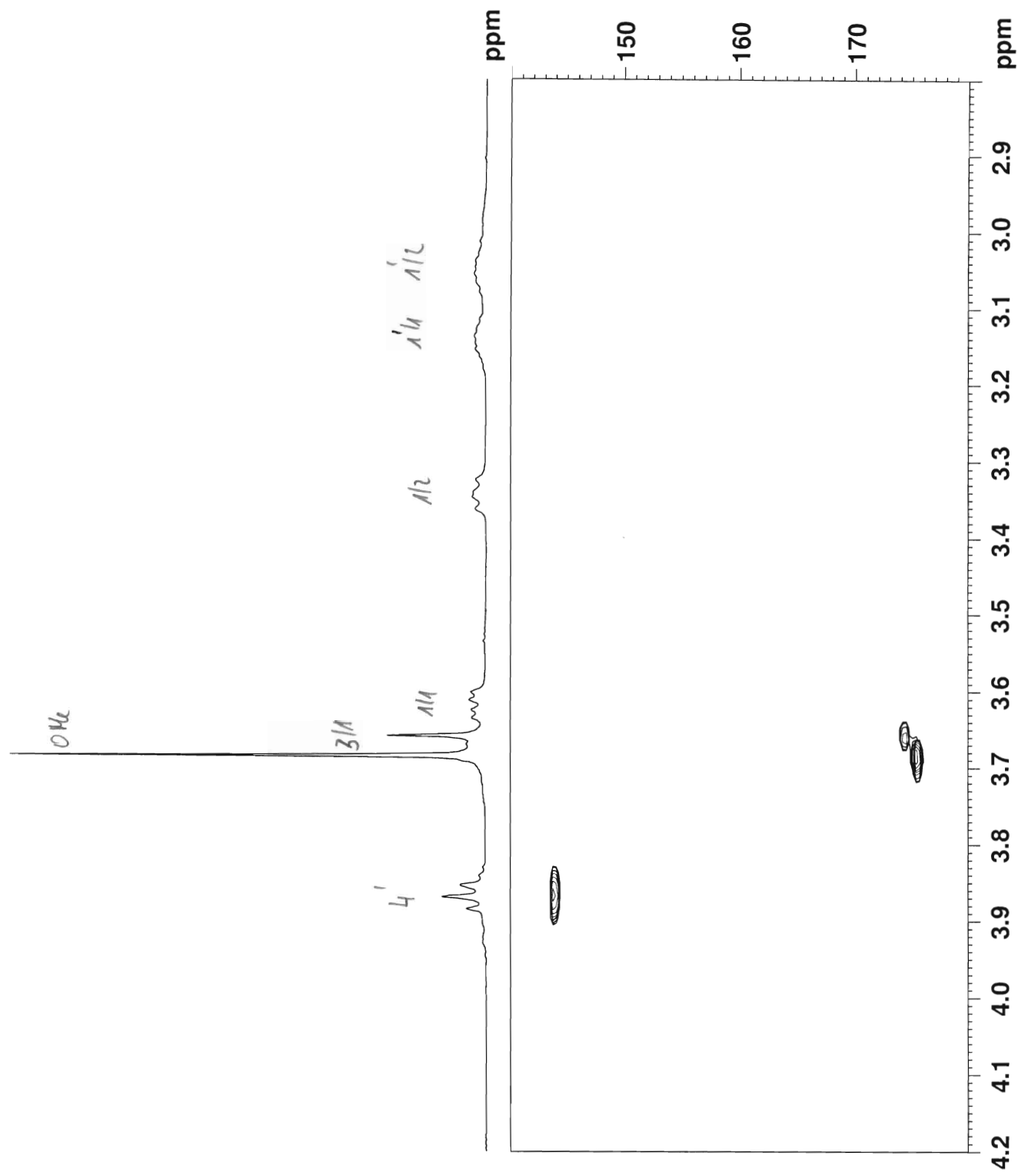
GABA 21d in cdcl3 (HMBC) 12.5.2011

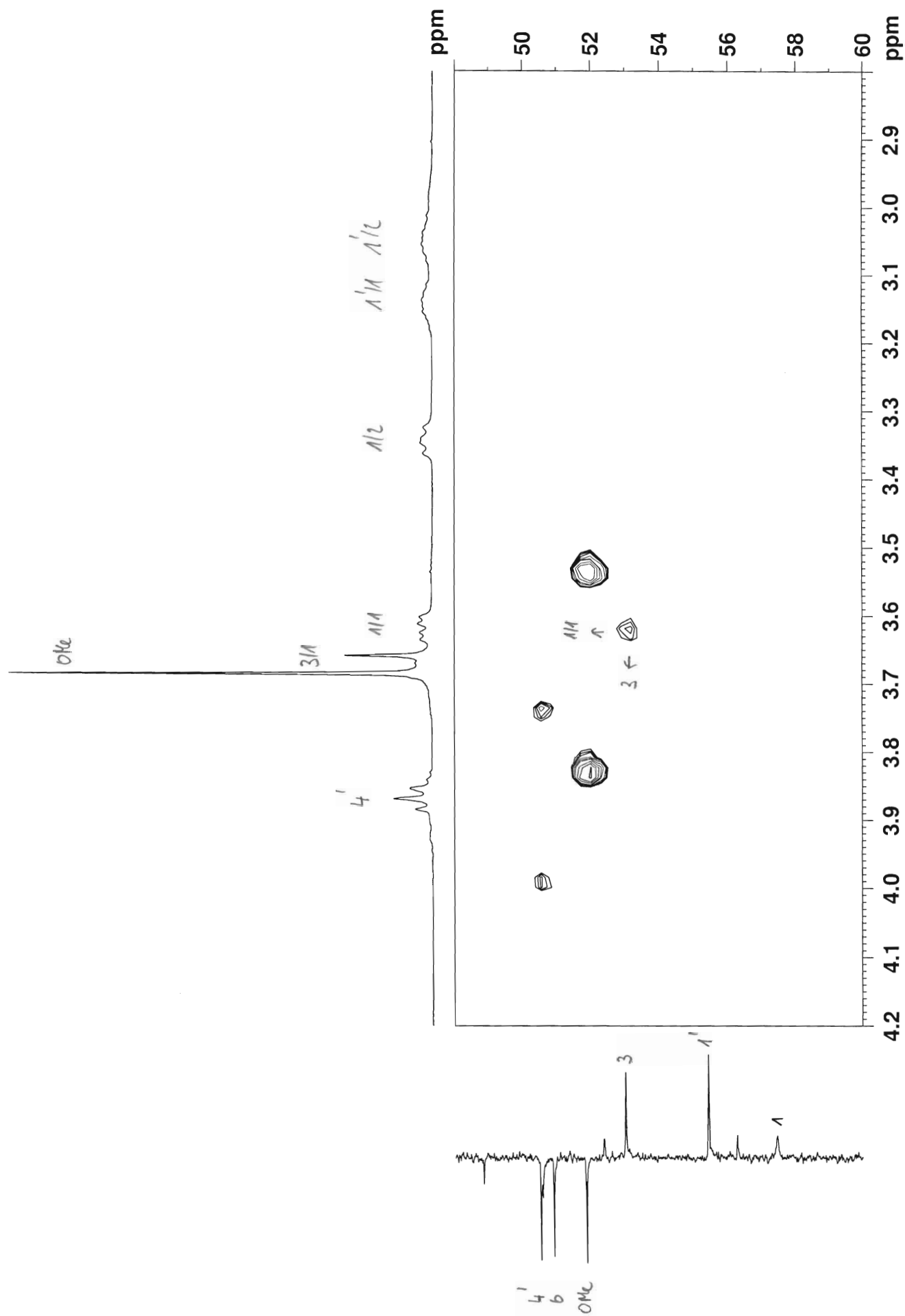


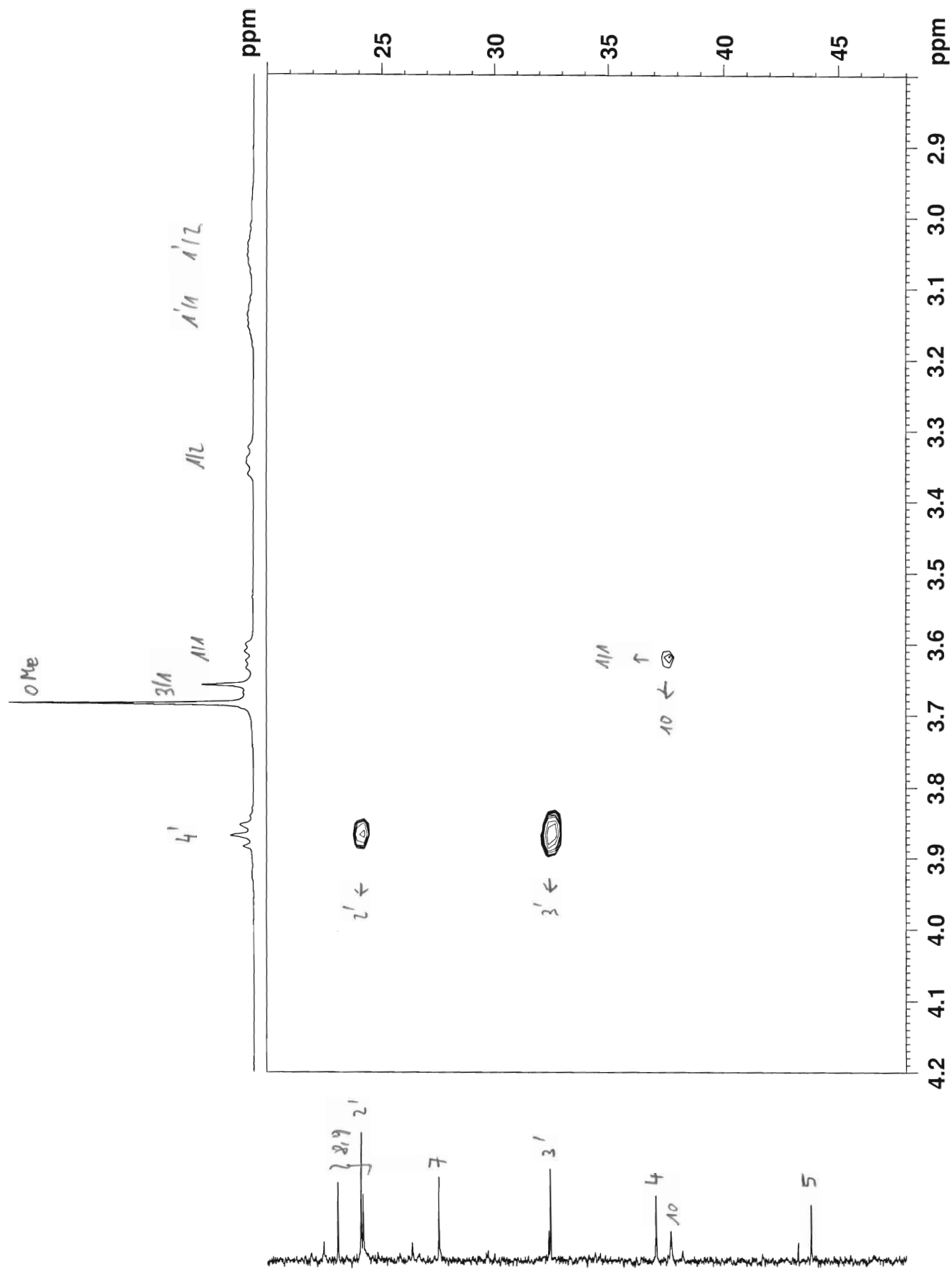




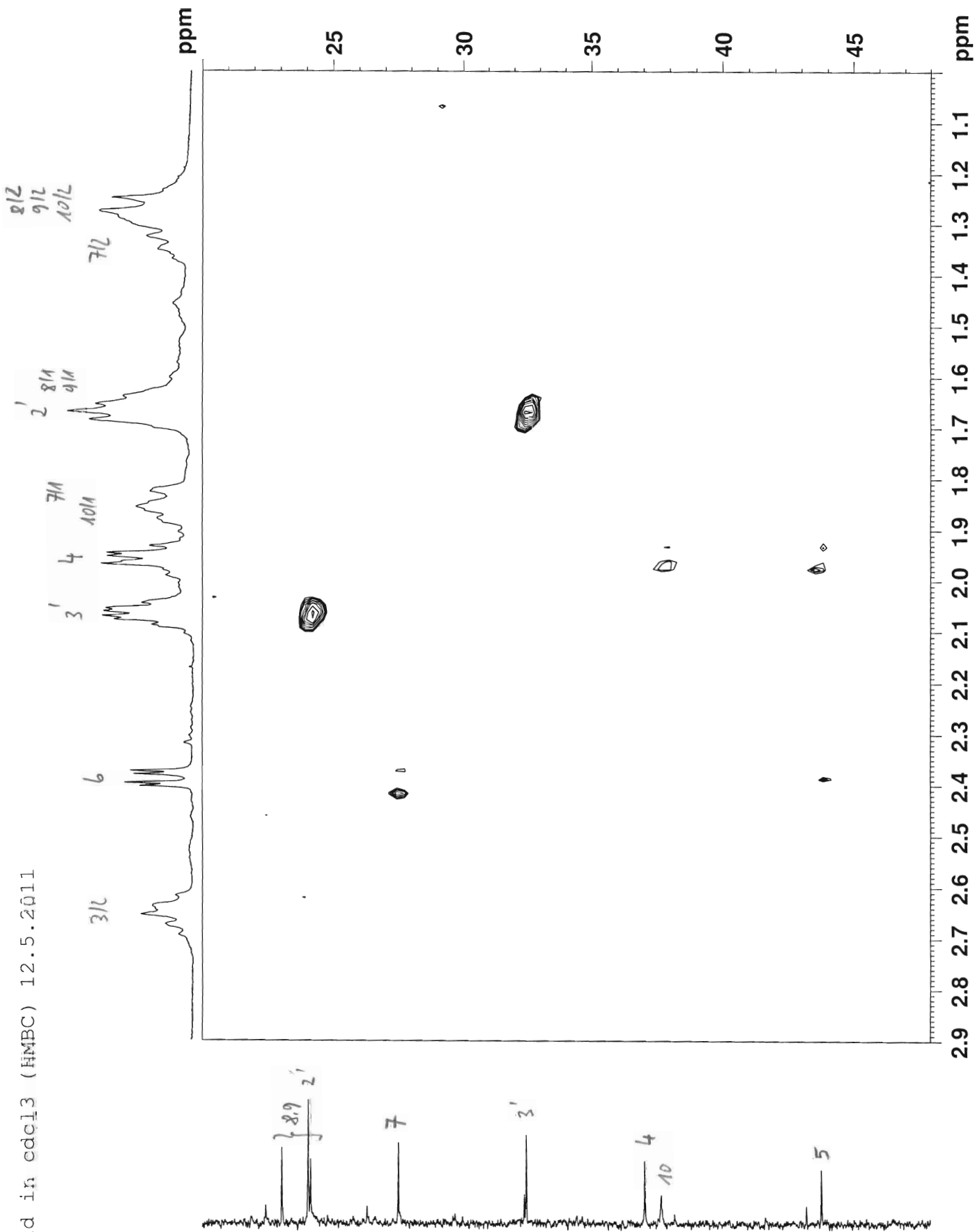








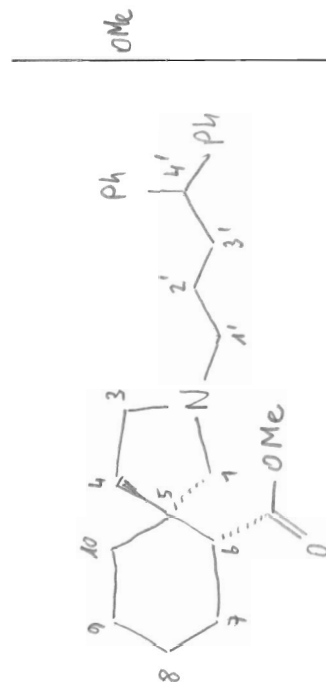
GABA 21d in cdcl3 (HMBC) 12.5.2011



7.2776
7.2619
7.2600
7.2487
7.2455
7.2405
7.2354
7.2329
7.2279
7.1692
7.1654
7.1610
7.1560
7.1522
7.1472
7.1428
7.1383
7.1352

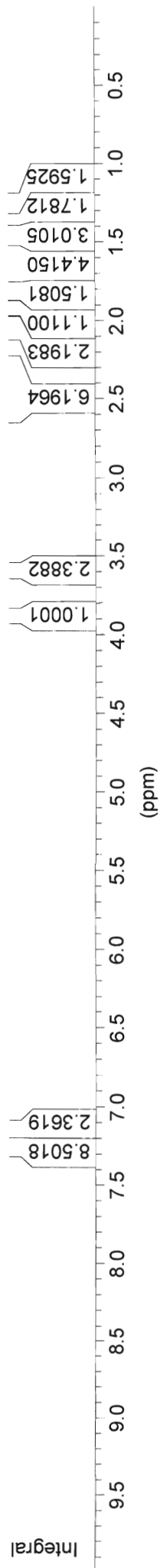
3.8970
3.8812
3.8655
3.5869

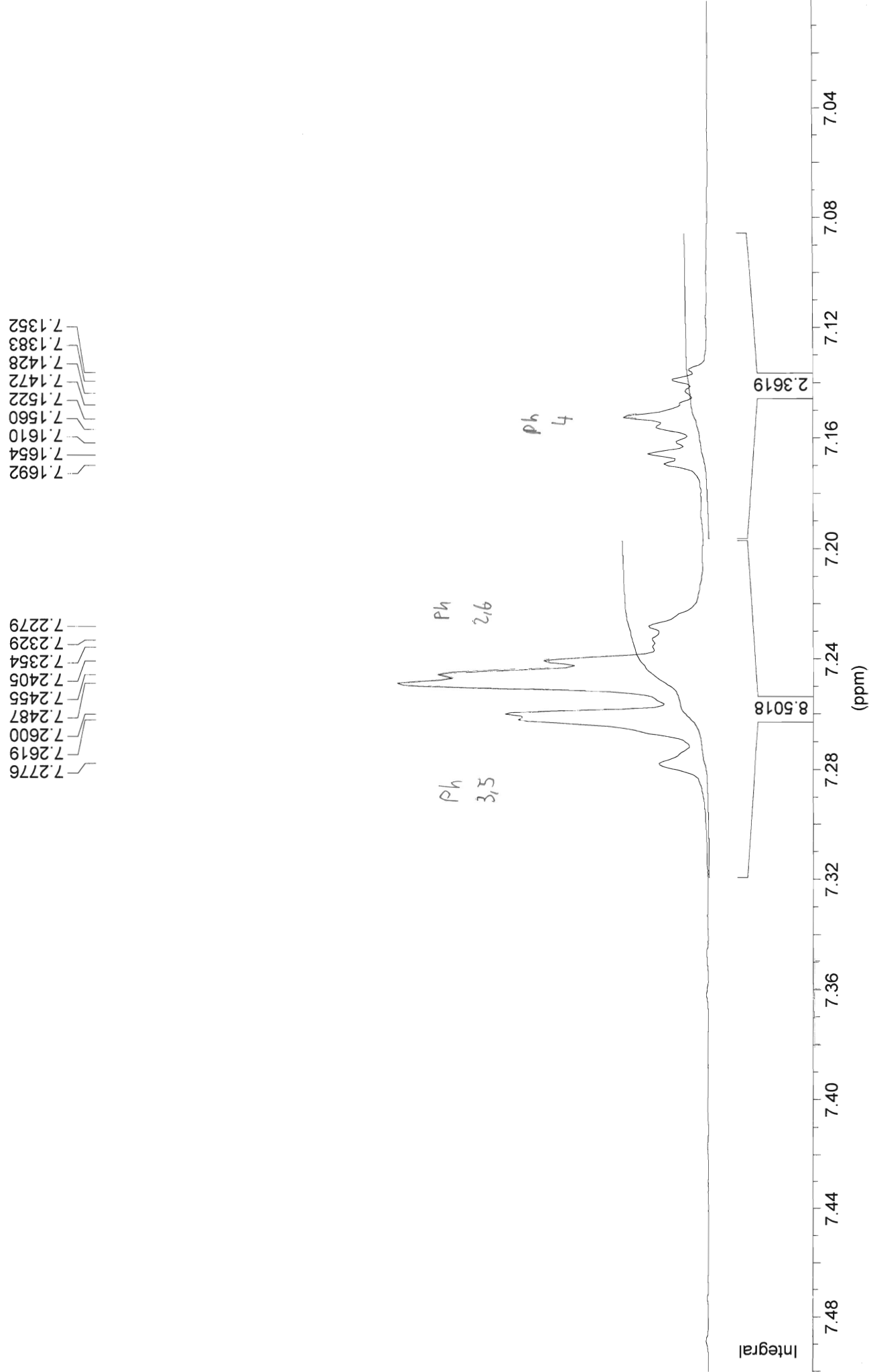
2.6514
2.4509
2.3892
2.2278
2.1093
1.9864
1.9567
1.8679
1.7494
1.6466
1.3957
1.3182
1.1839

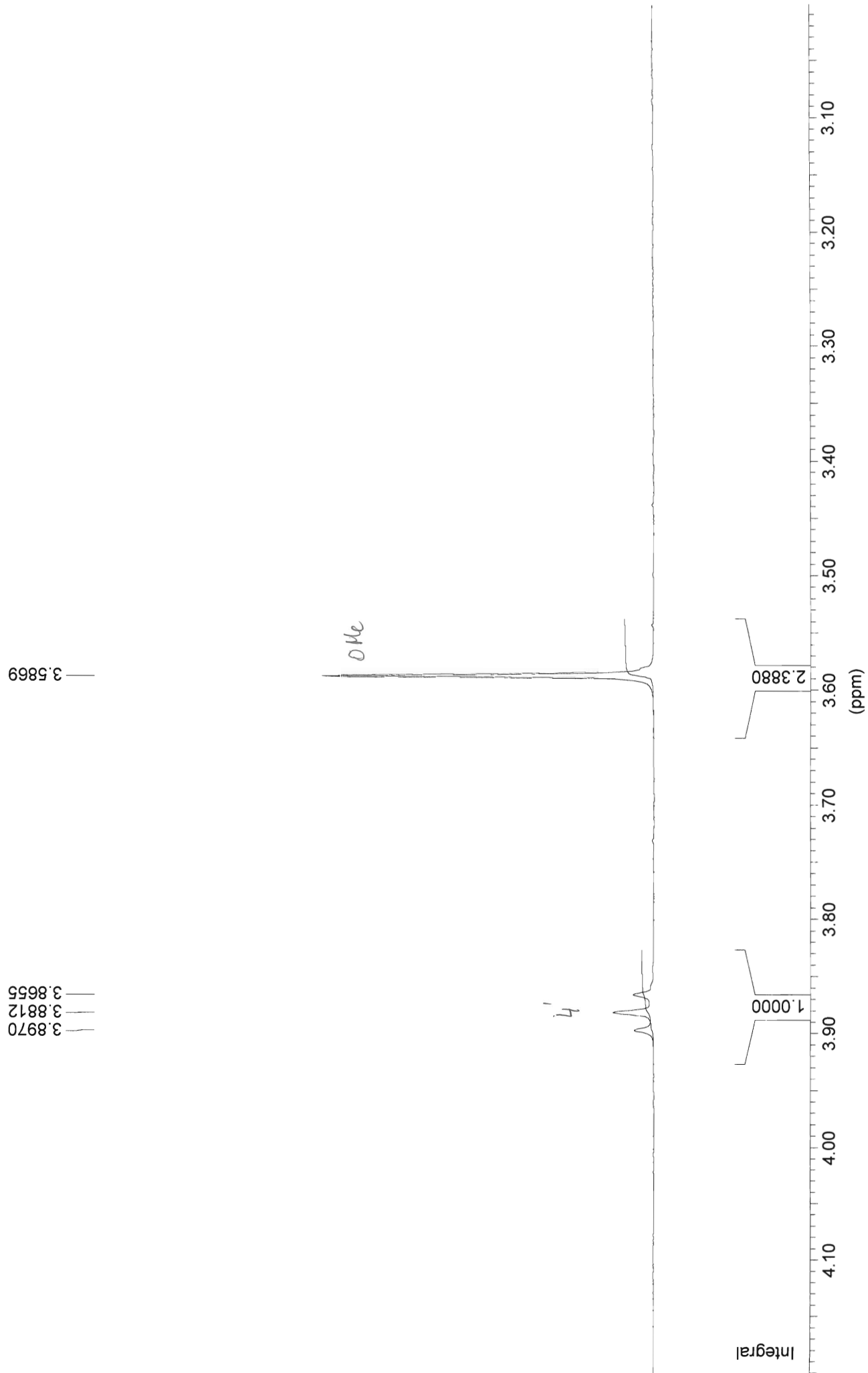


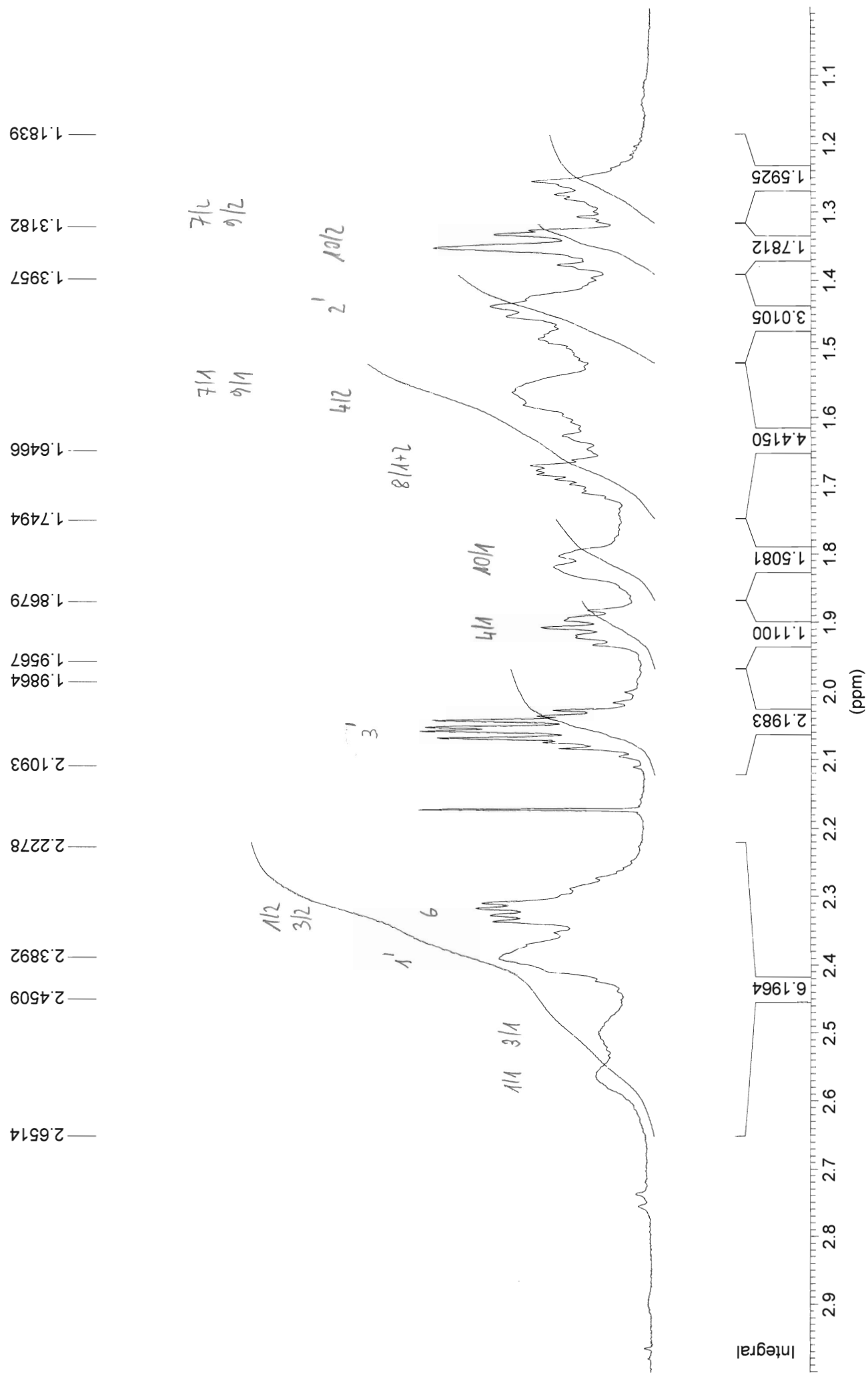
4'

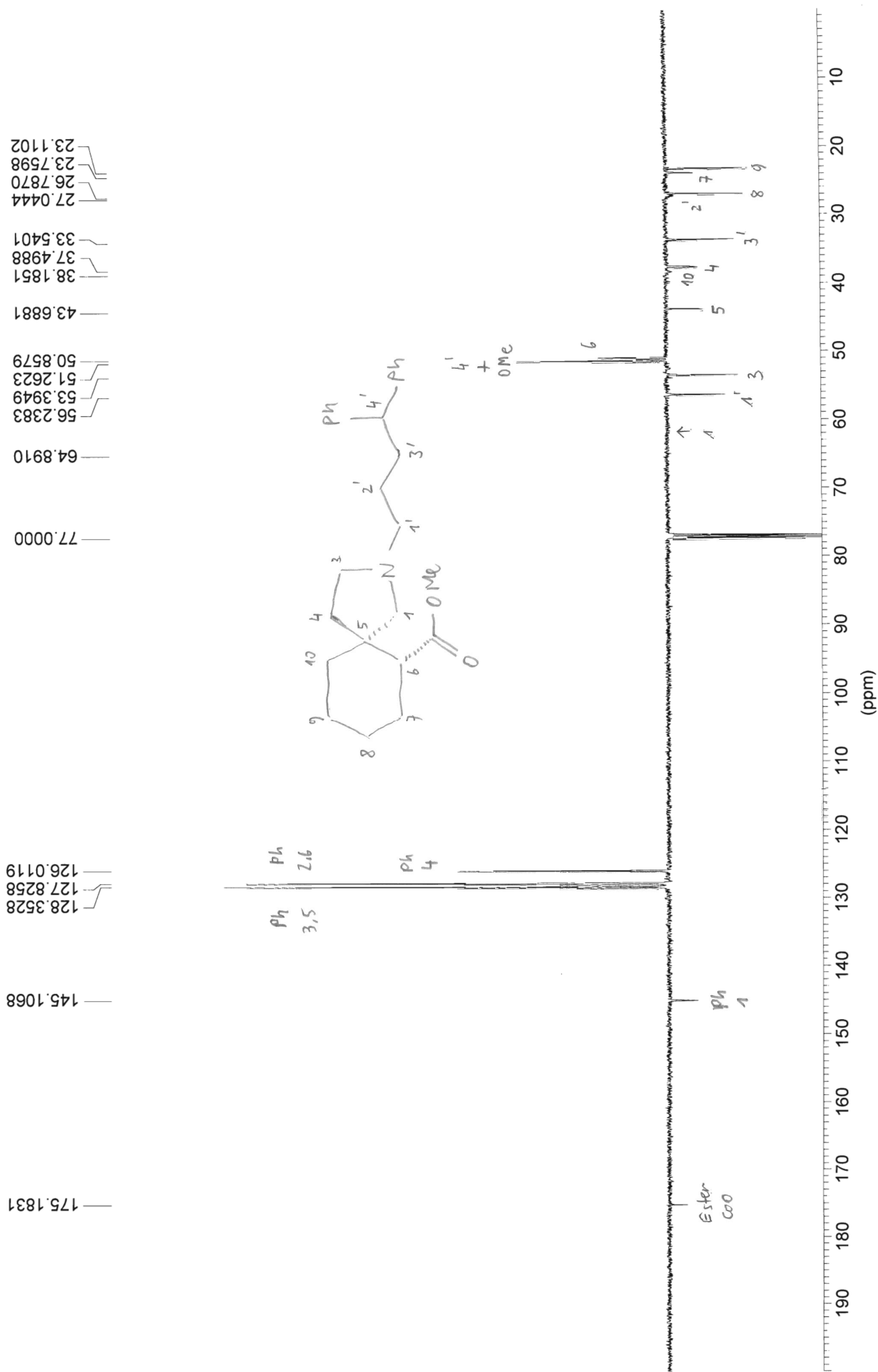
Ph H

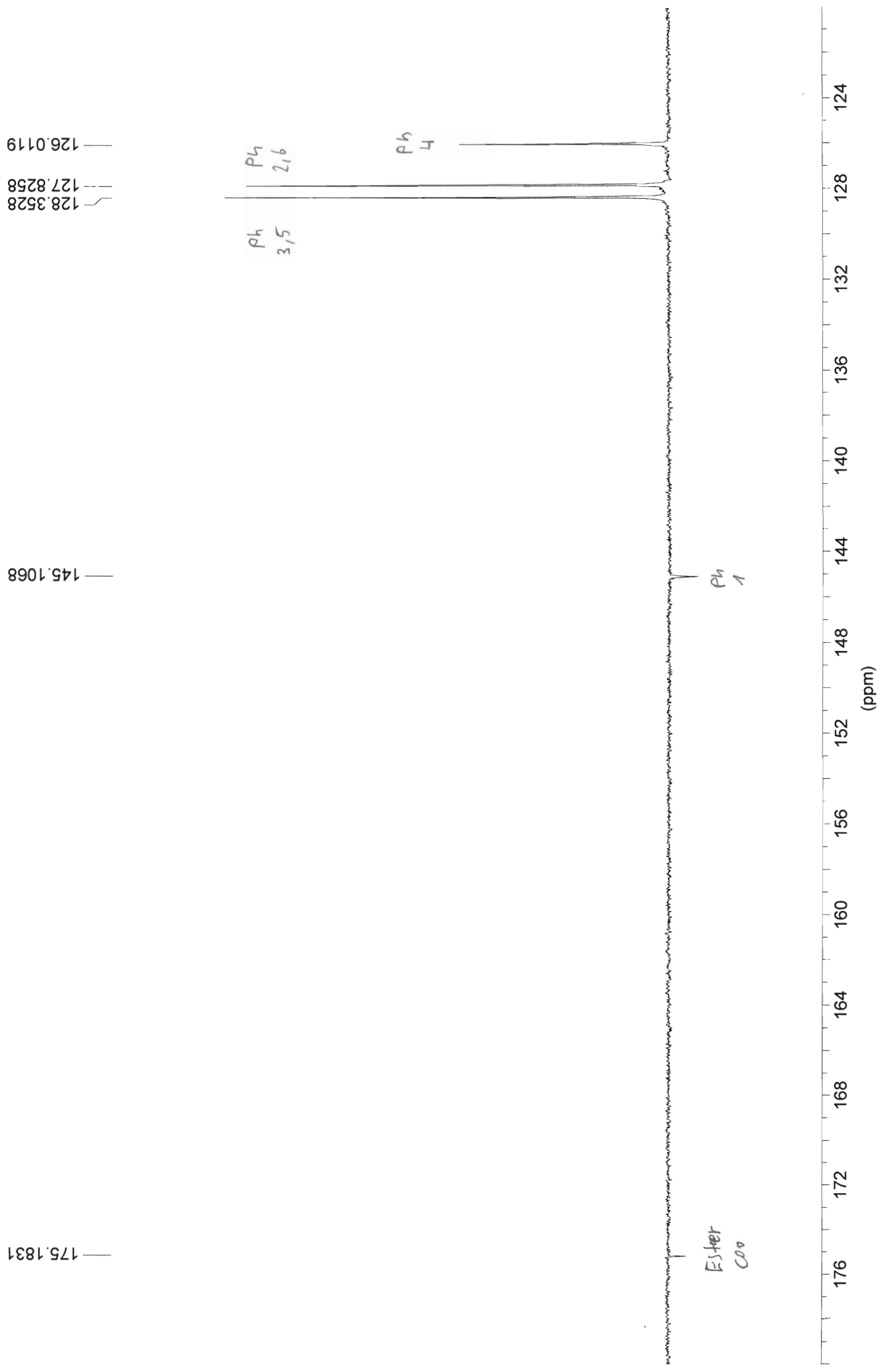


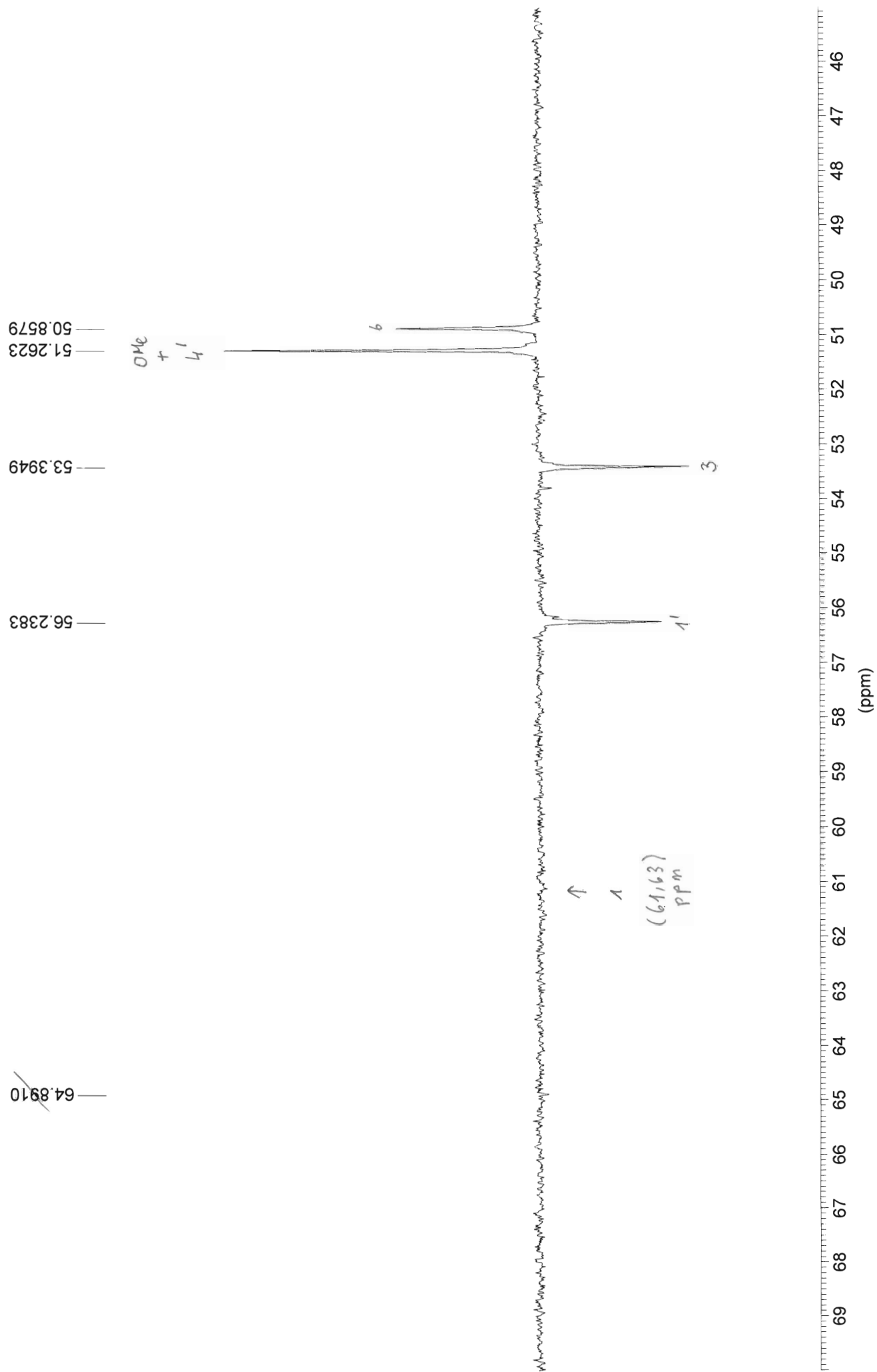


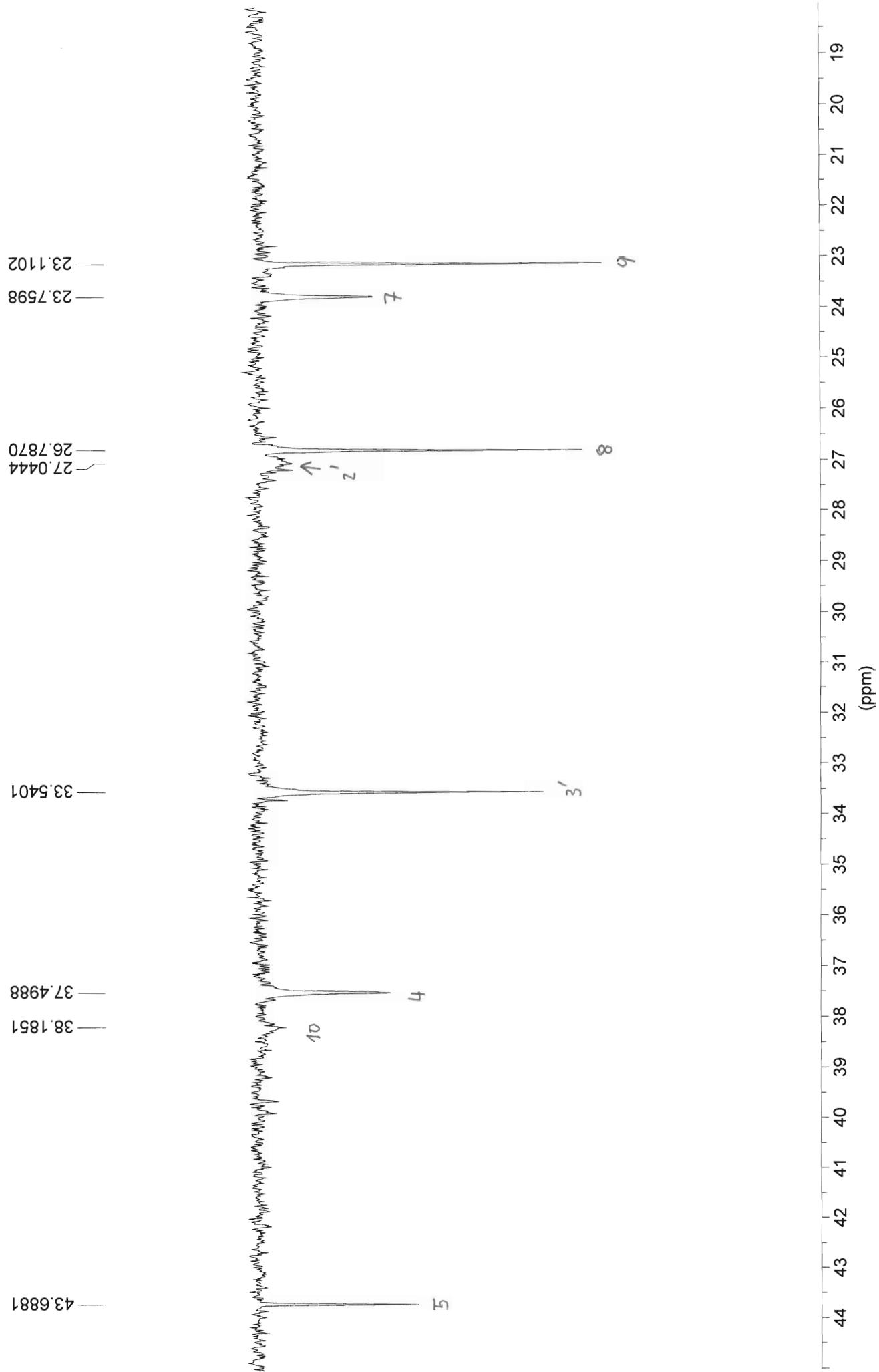




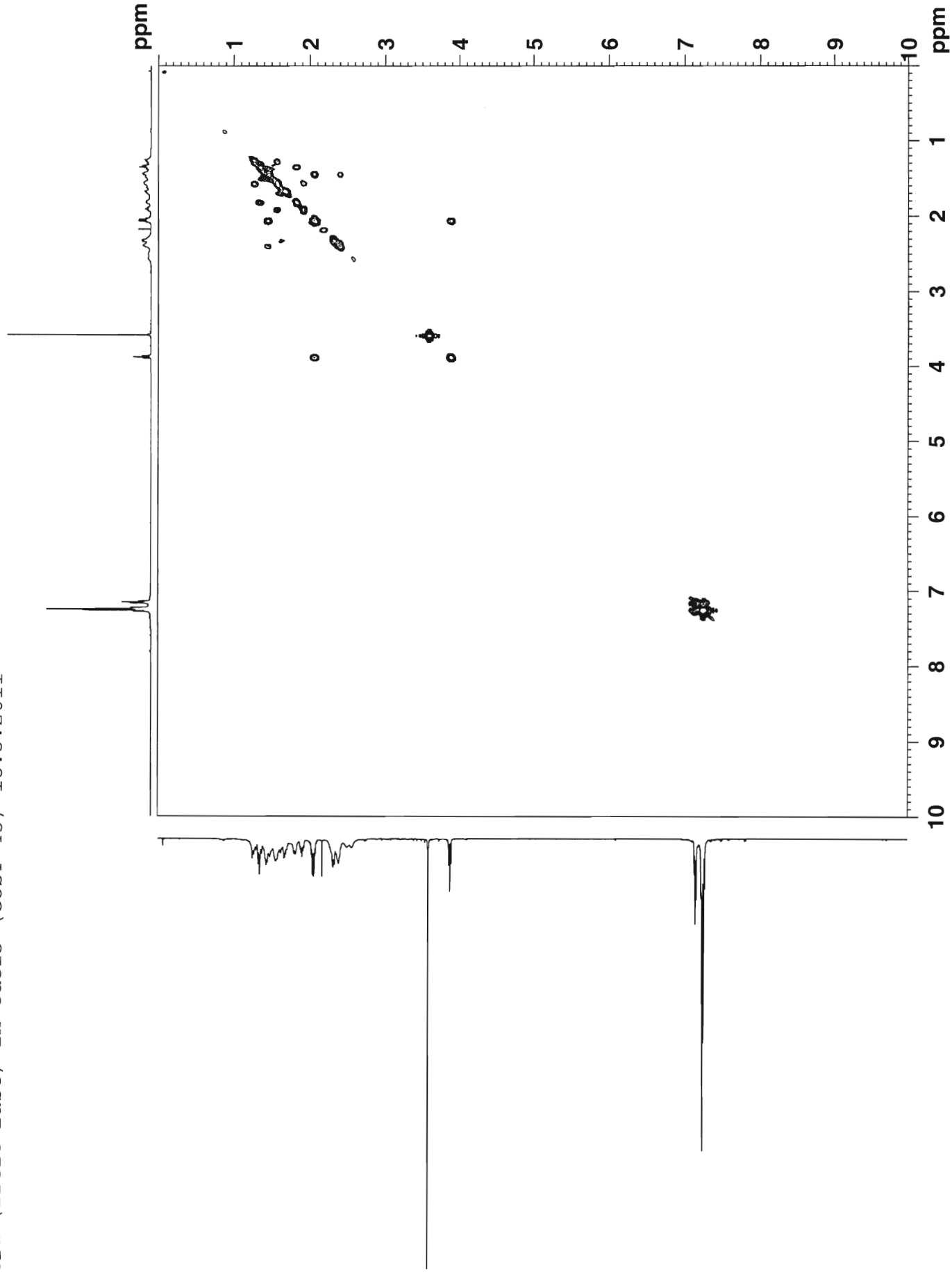


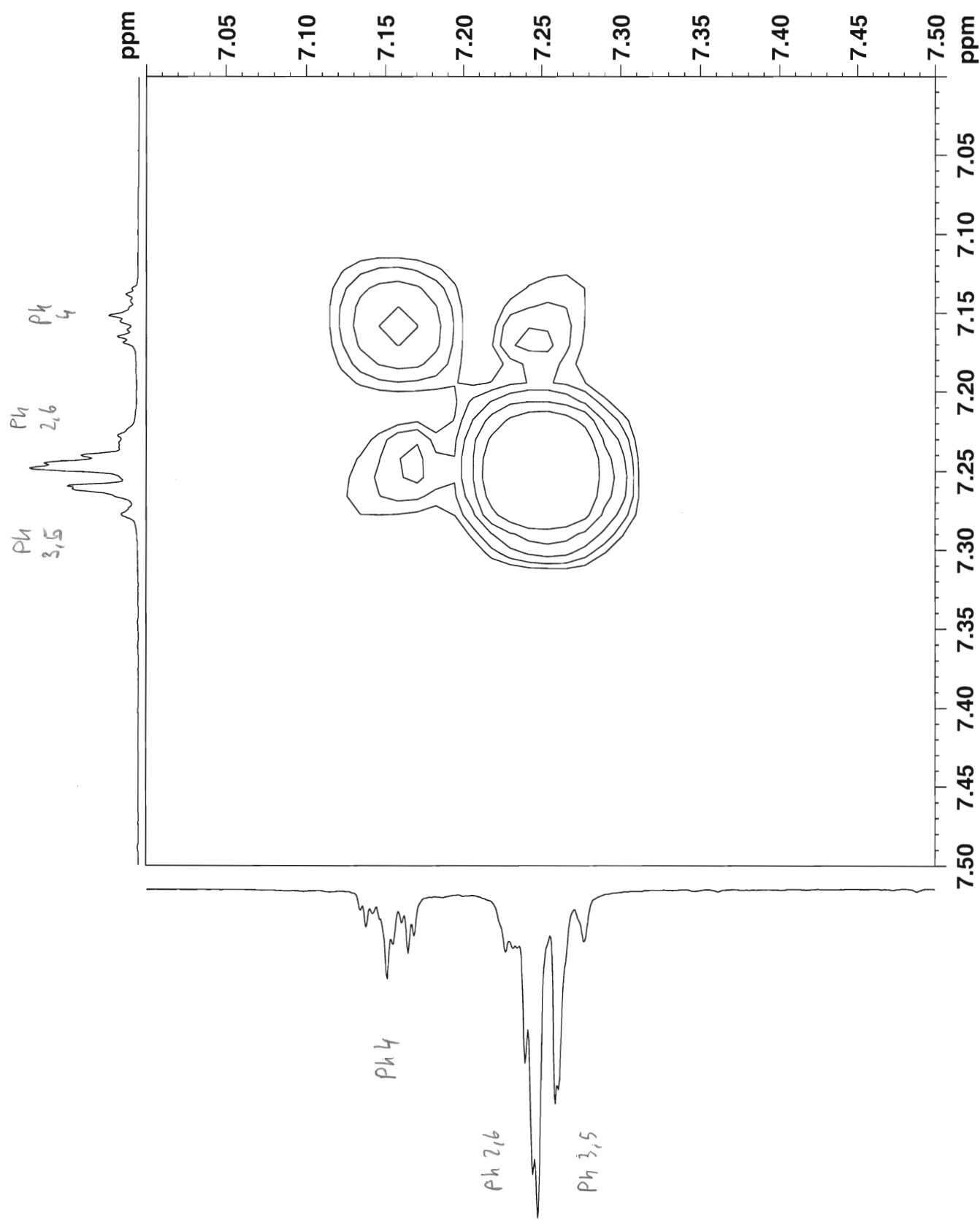




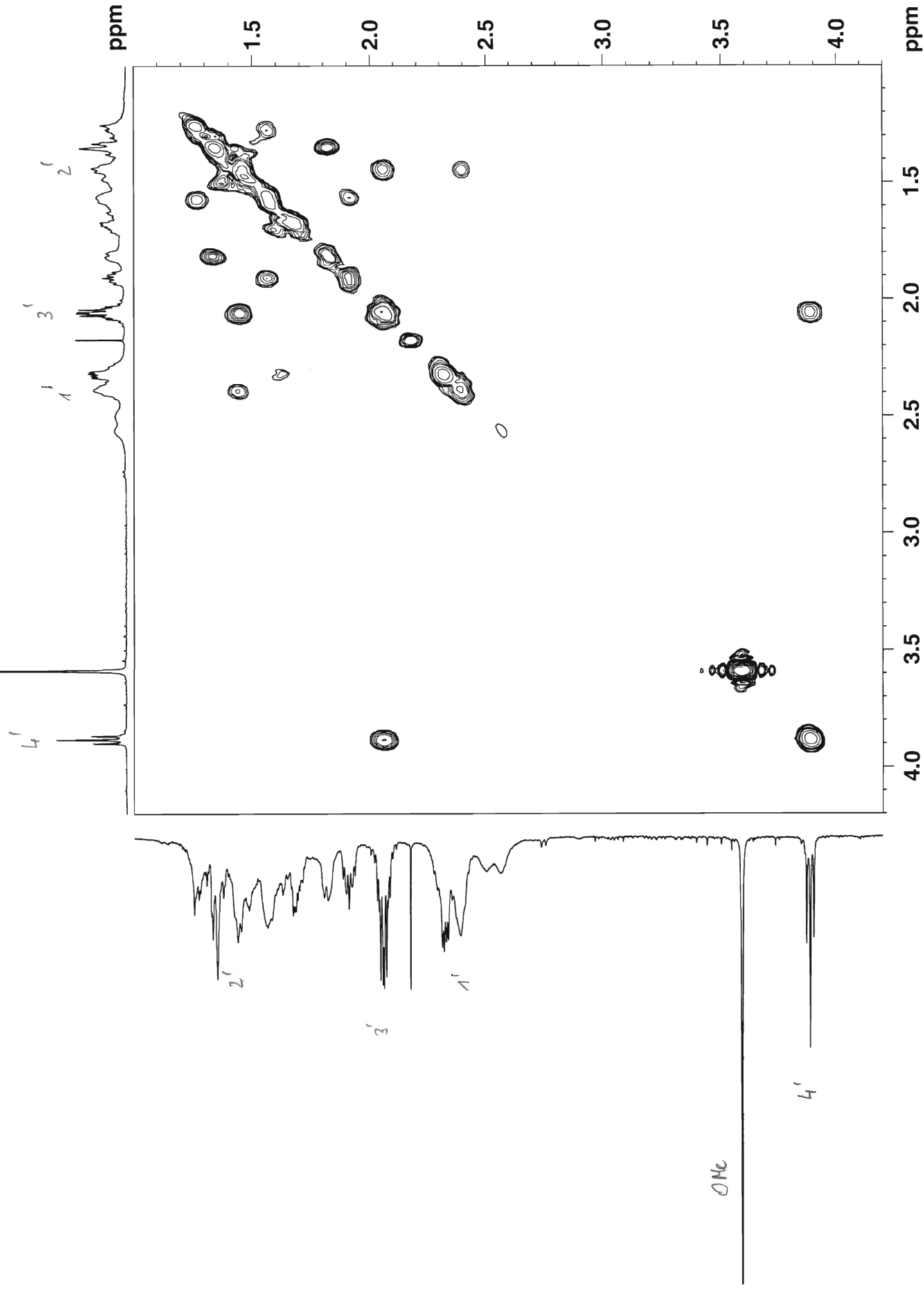


GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (COSY 45) 18.5.2011

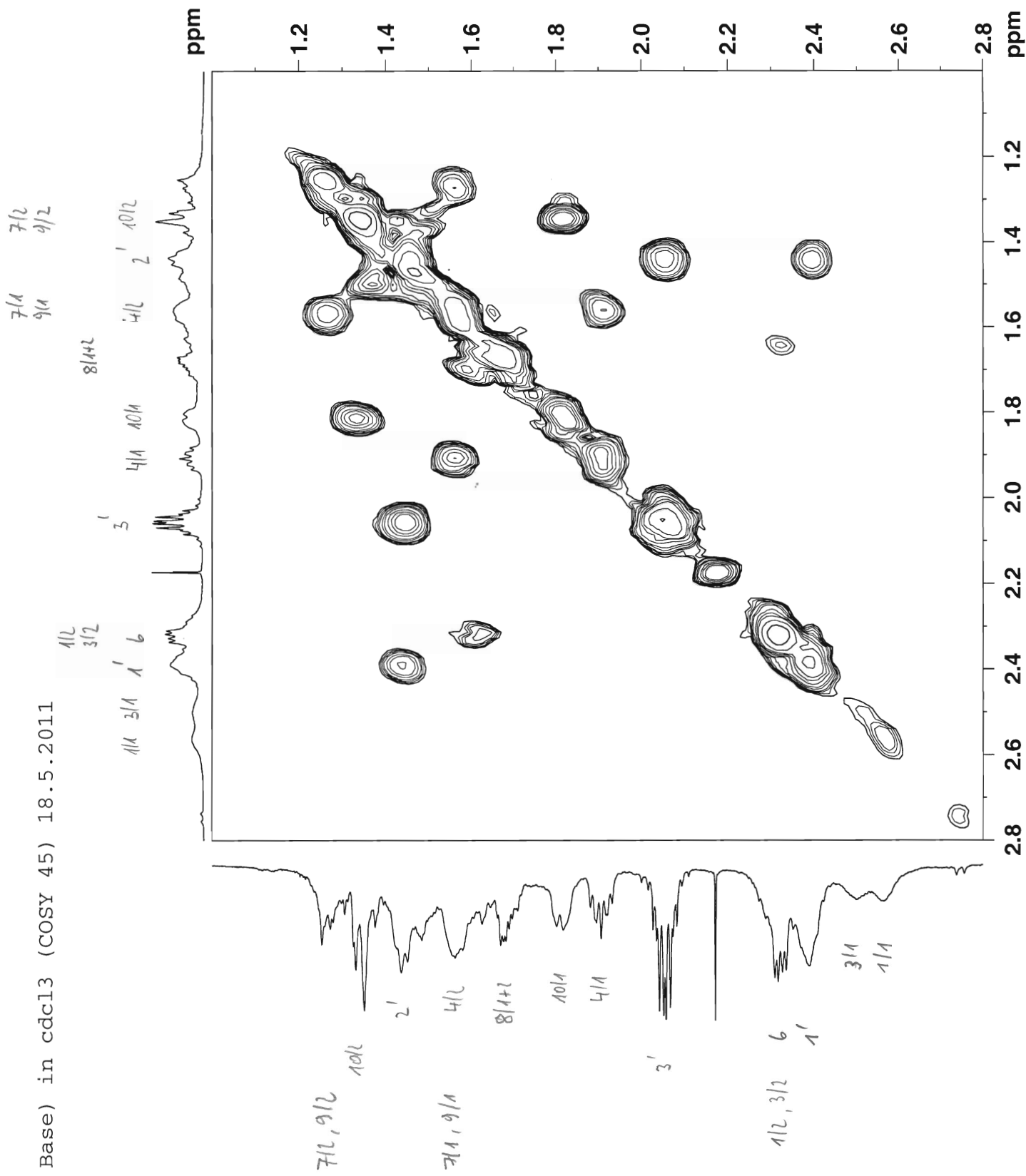




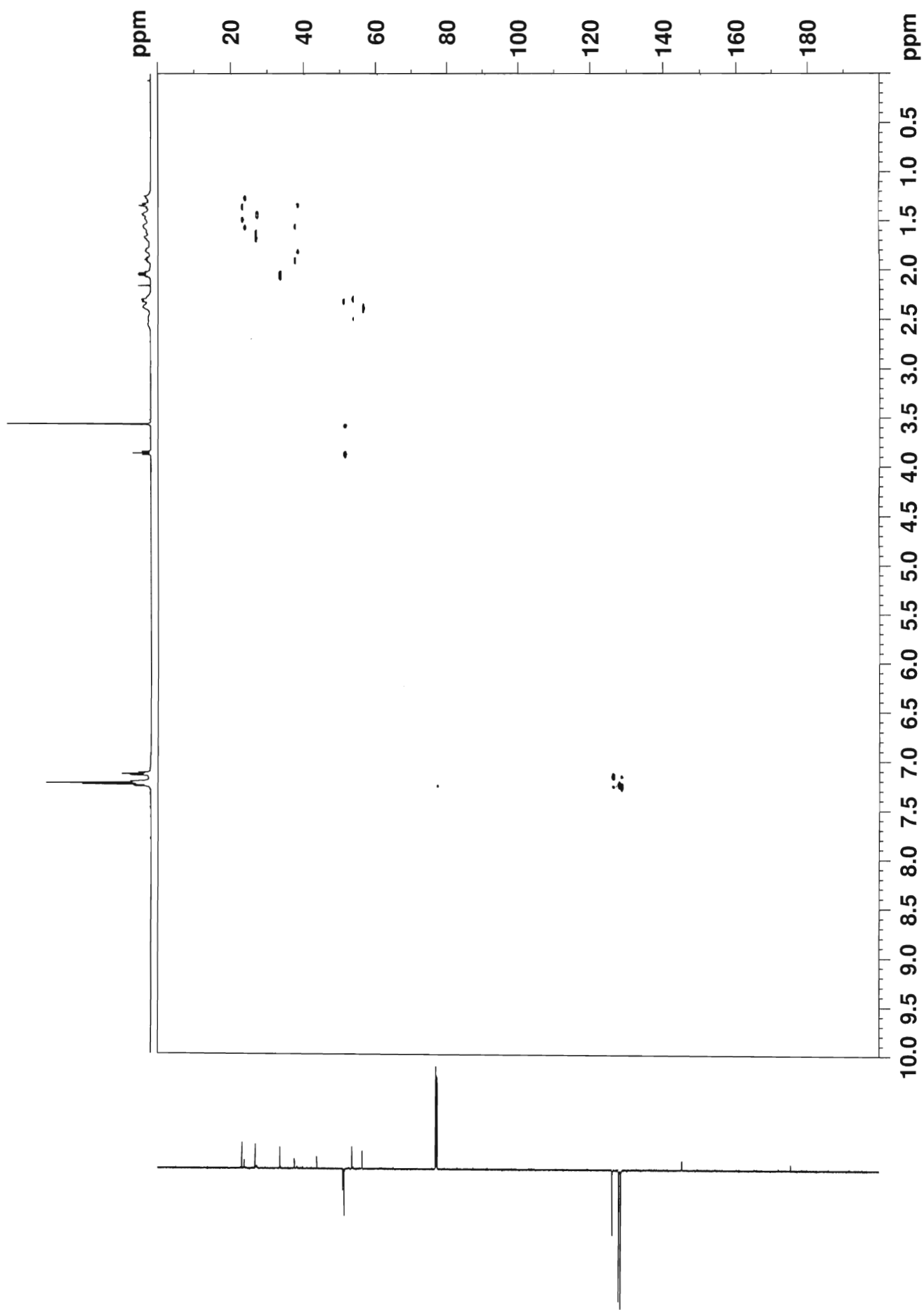
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (COSY 45) 18.5.2011

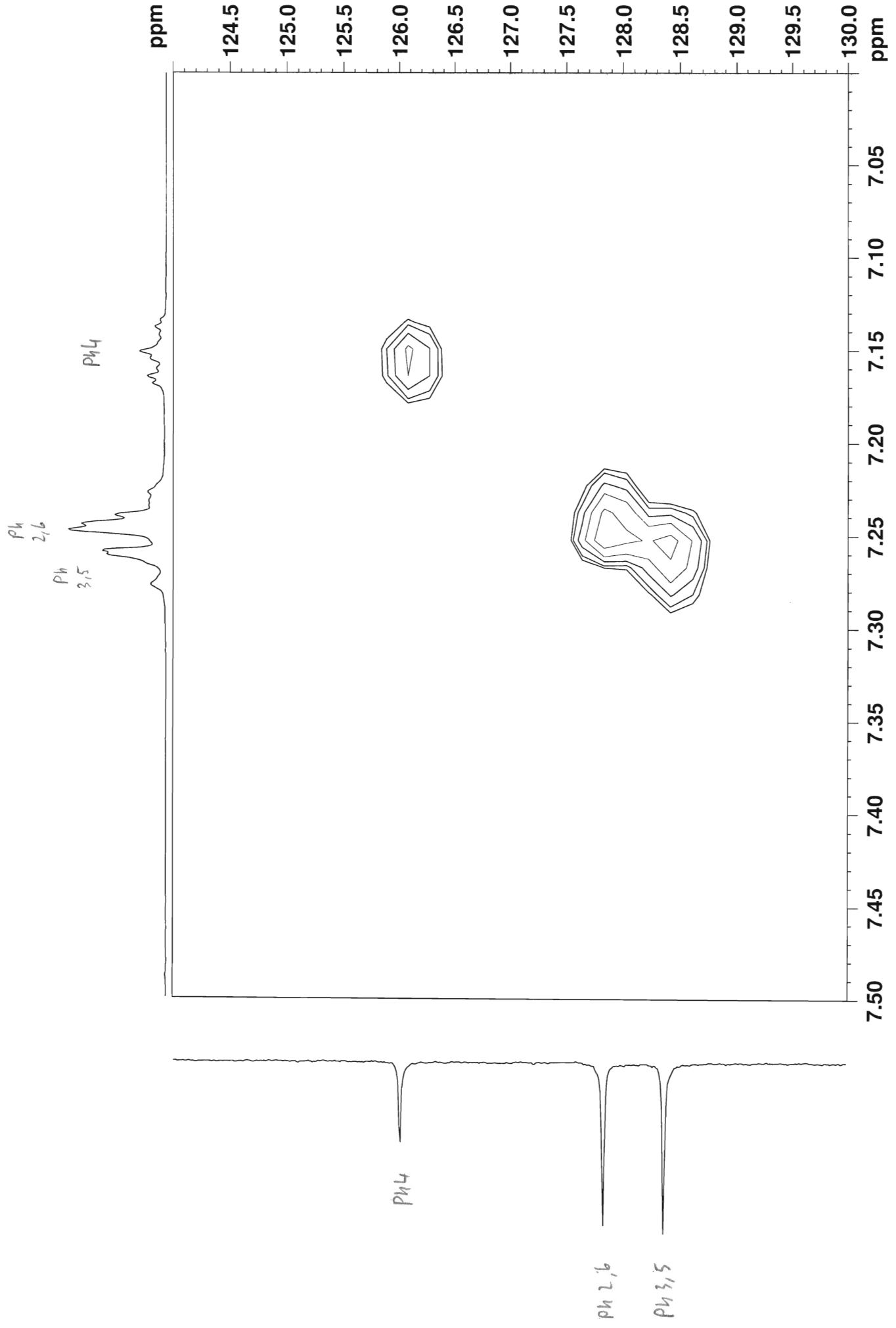


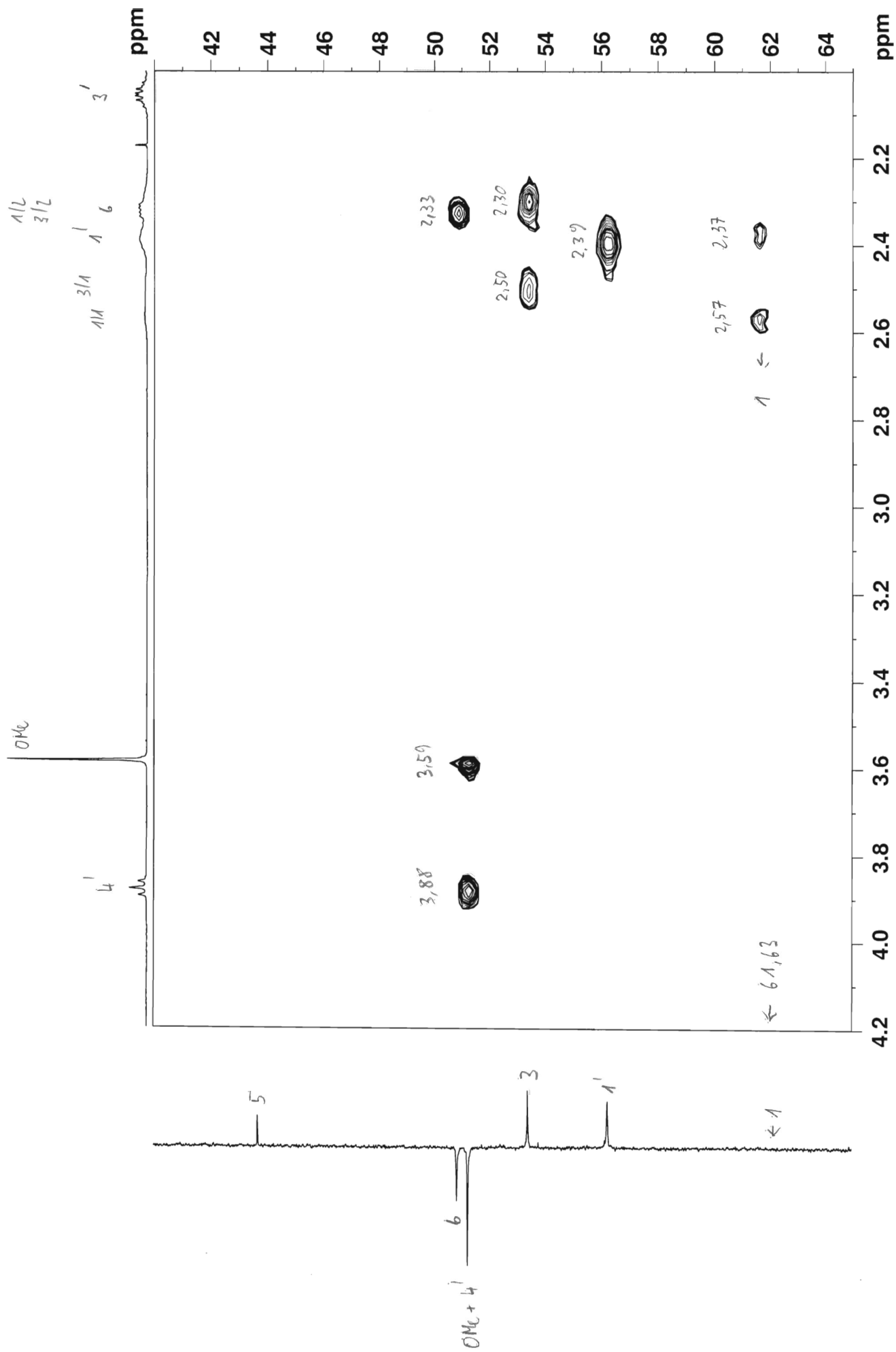
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (COSY 45) 18.5.2011



GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HSQC) 18.5.2011







GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HSQC) 18.5.2011

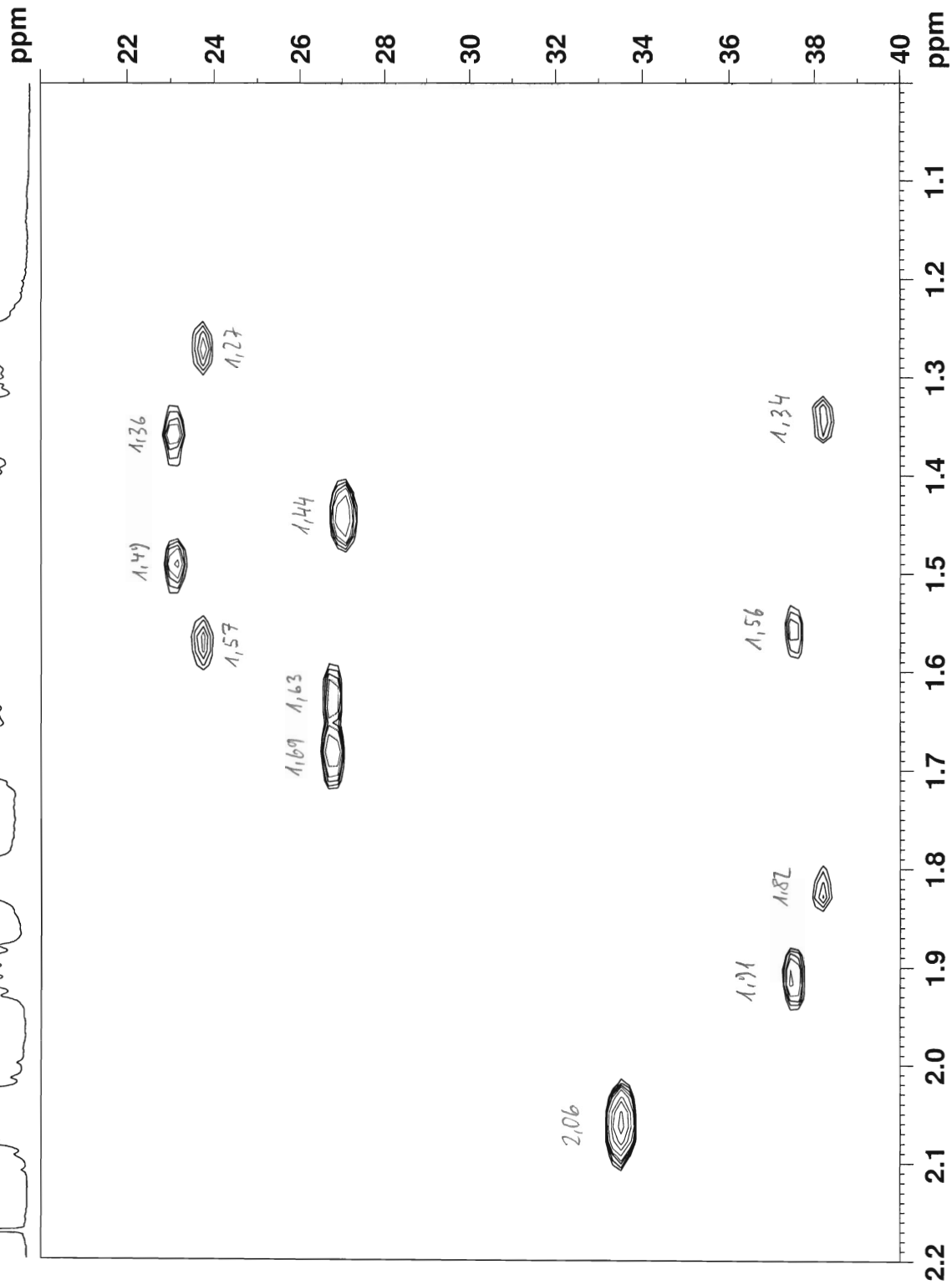
7/1
9/1

7/2
9/2

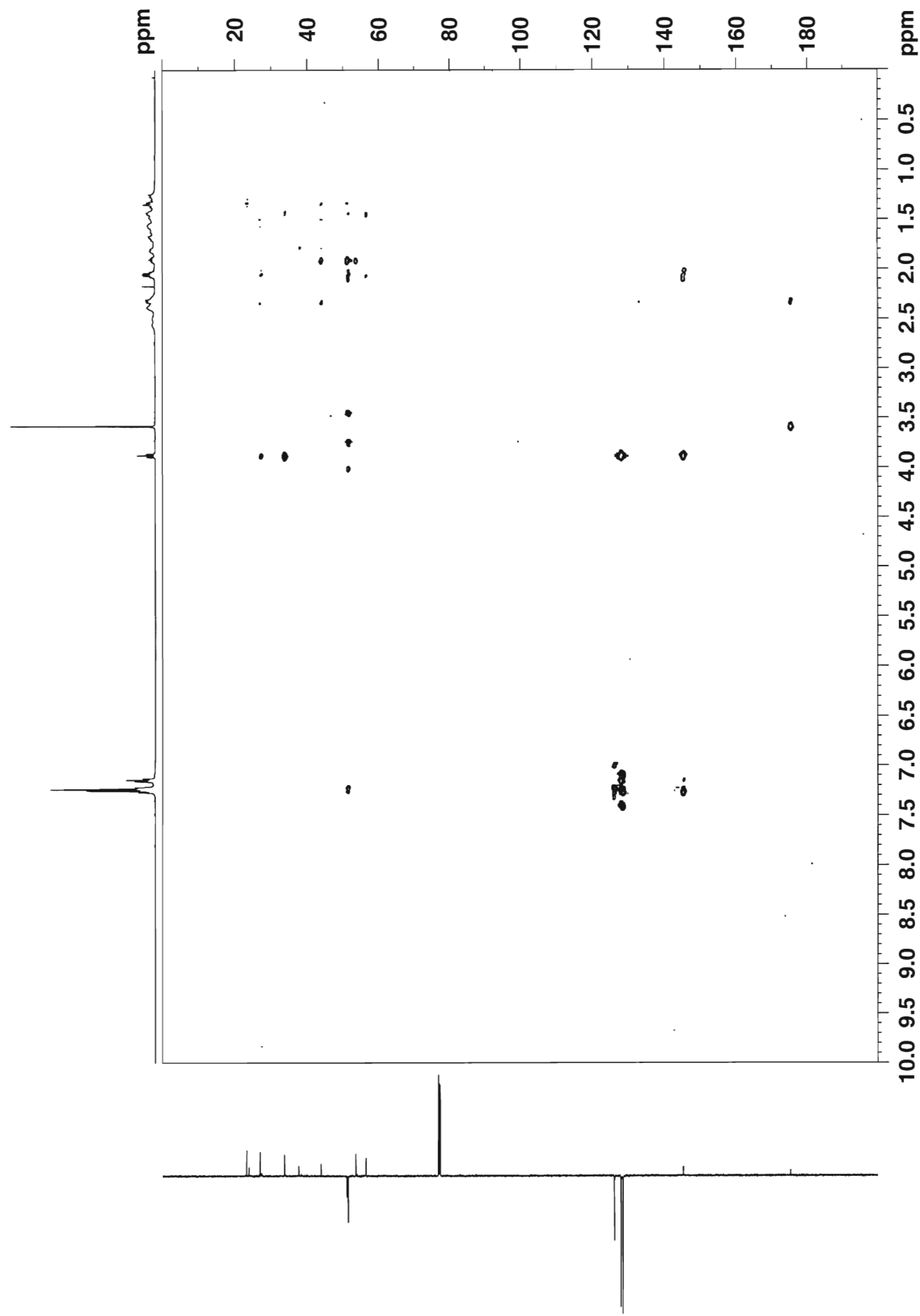
3'

2'
10/2

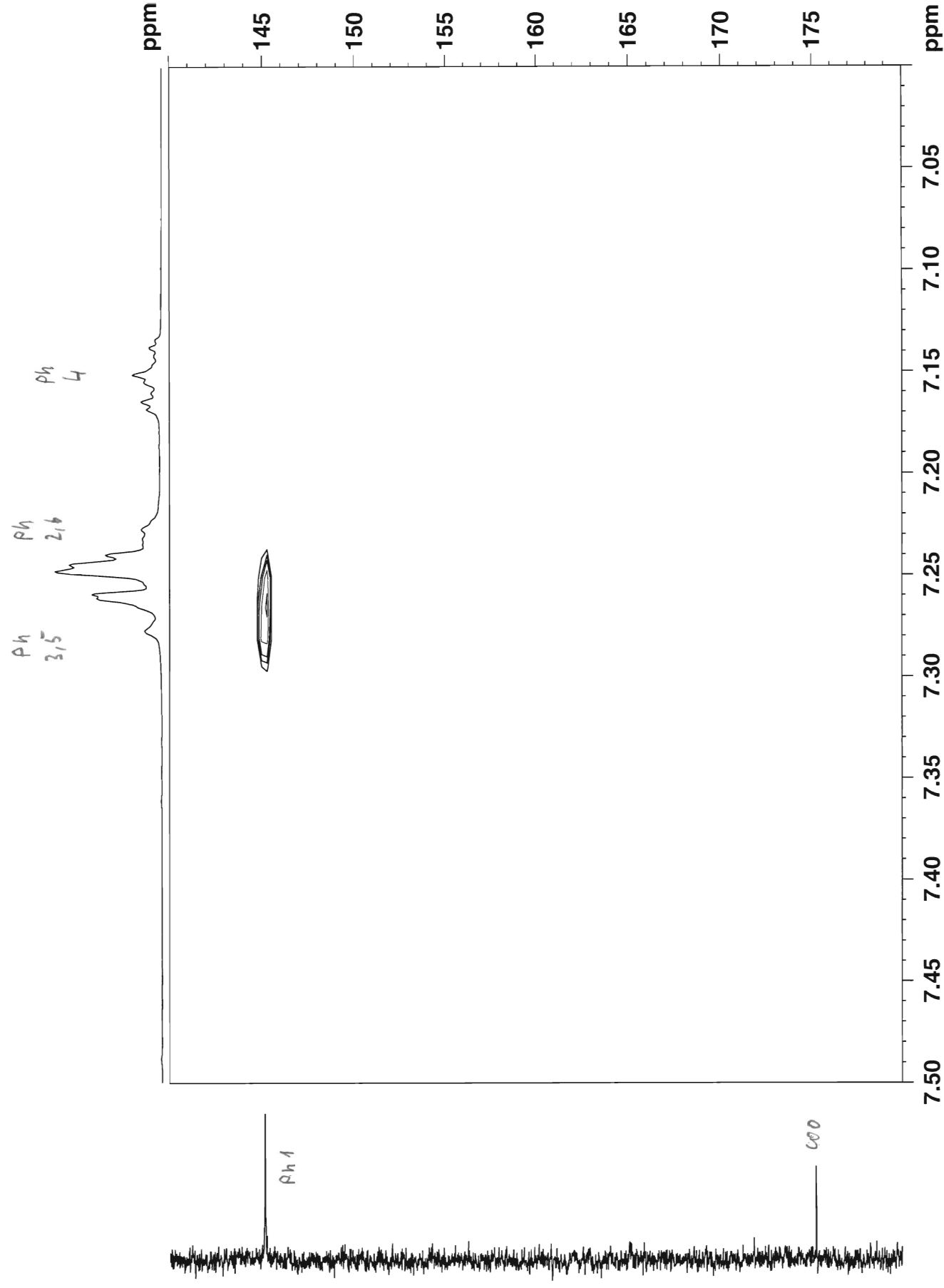
4/1 10/1 8/14 4/2



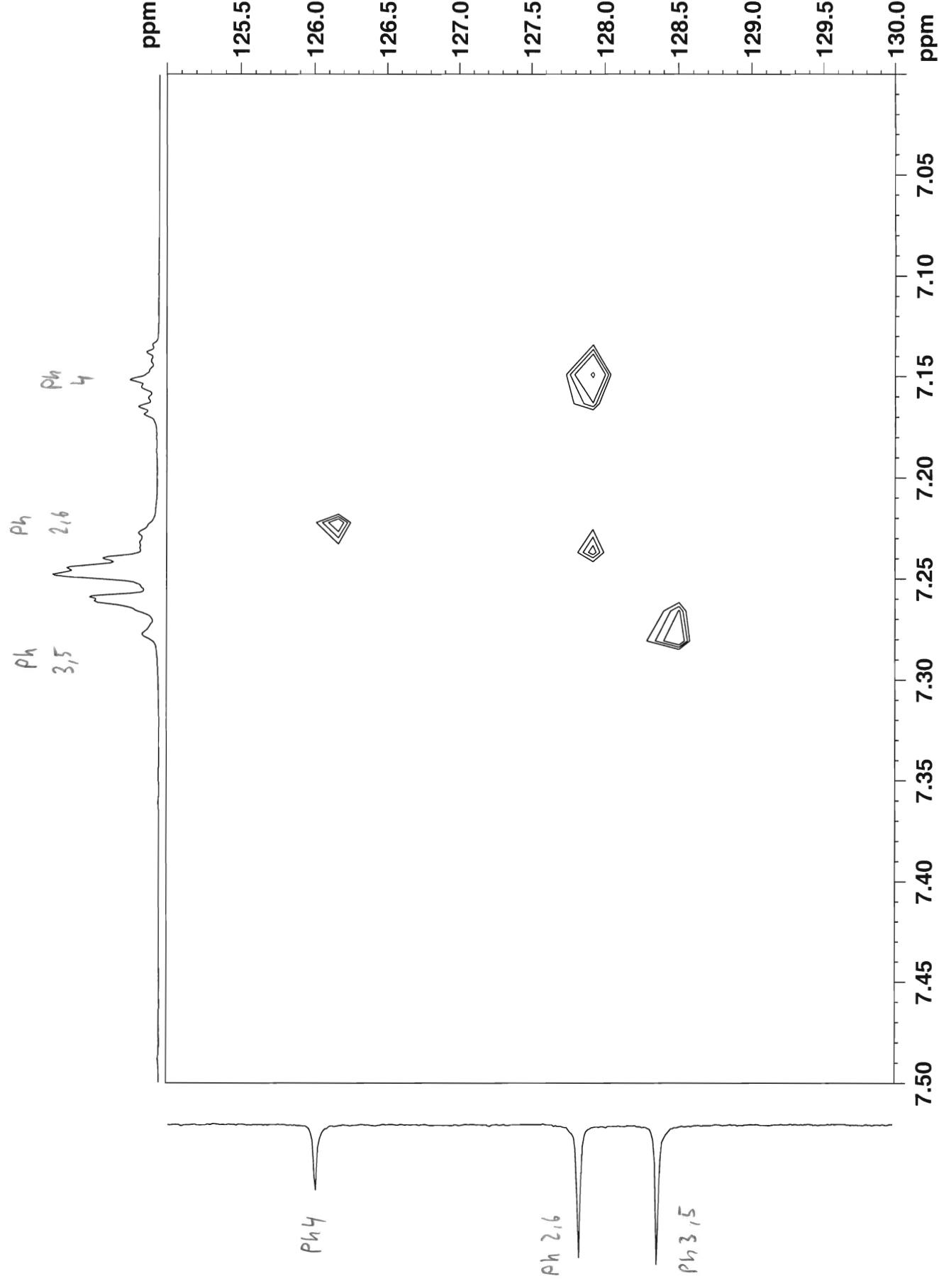
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



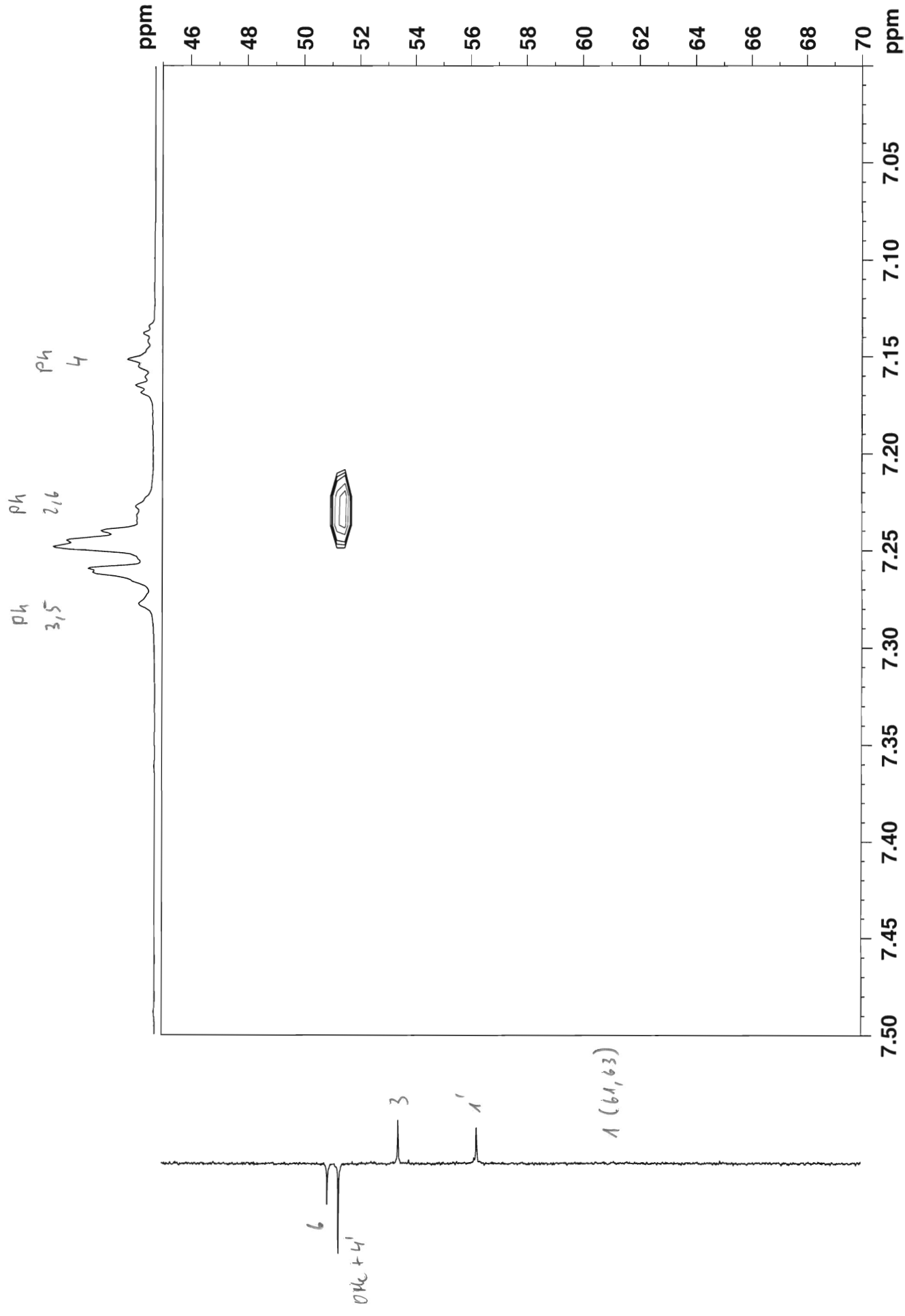
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



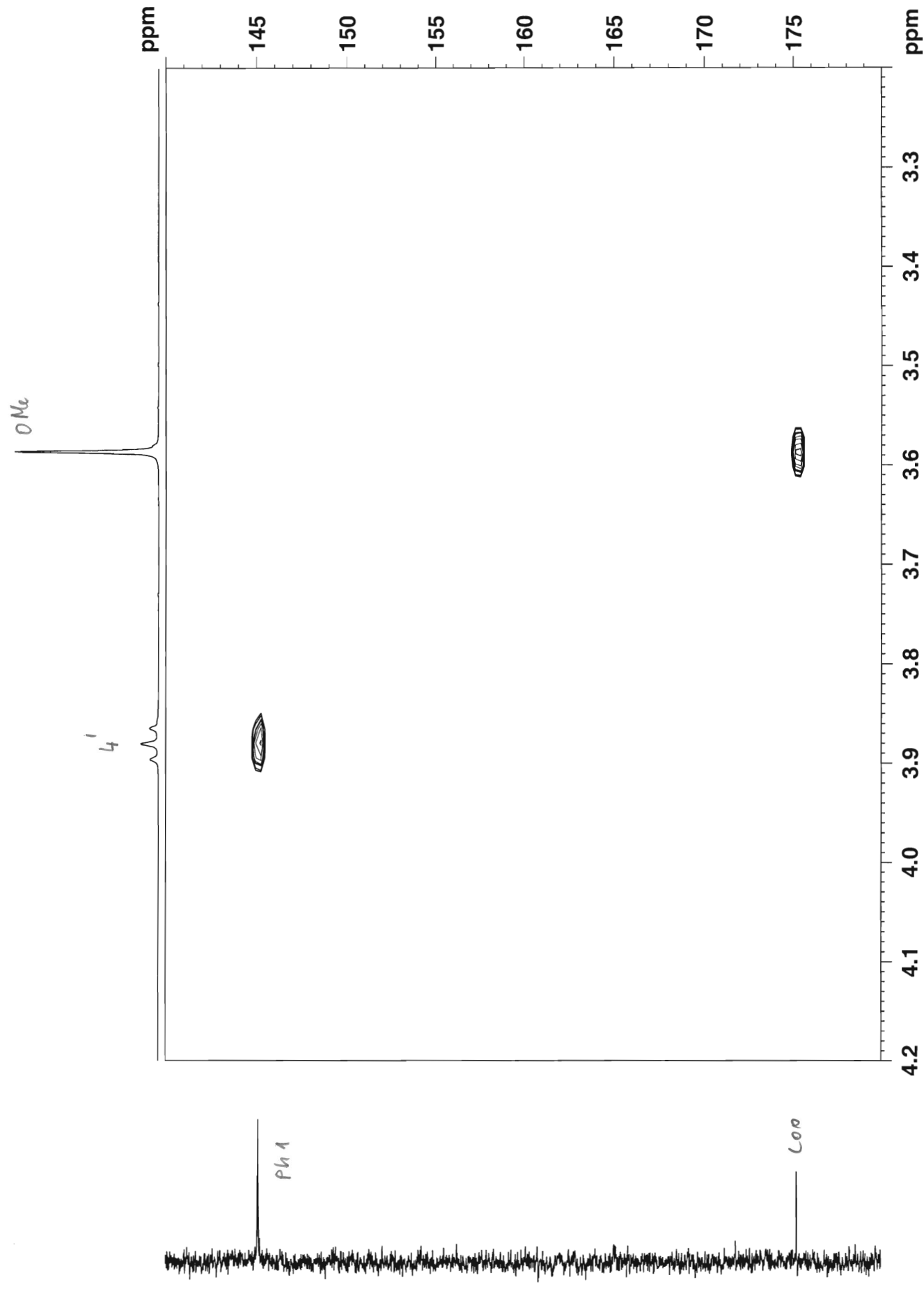
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



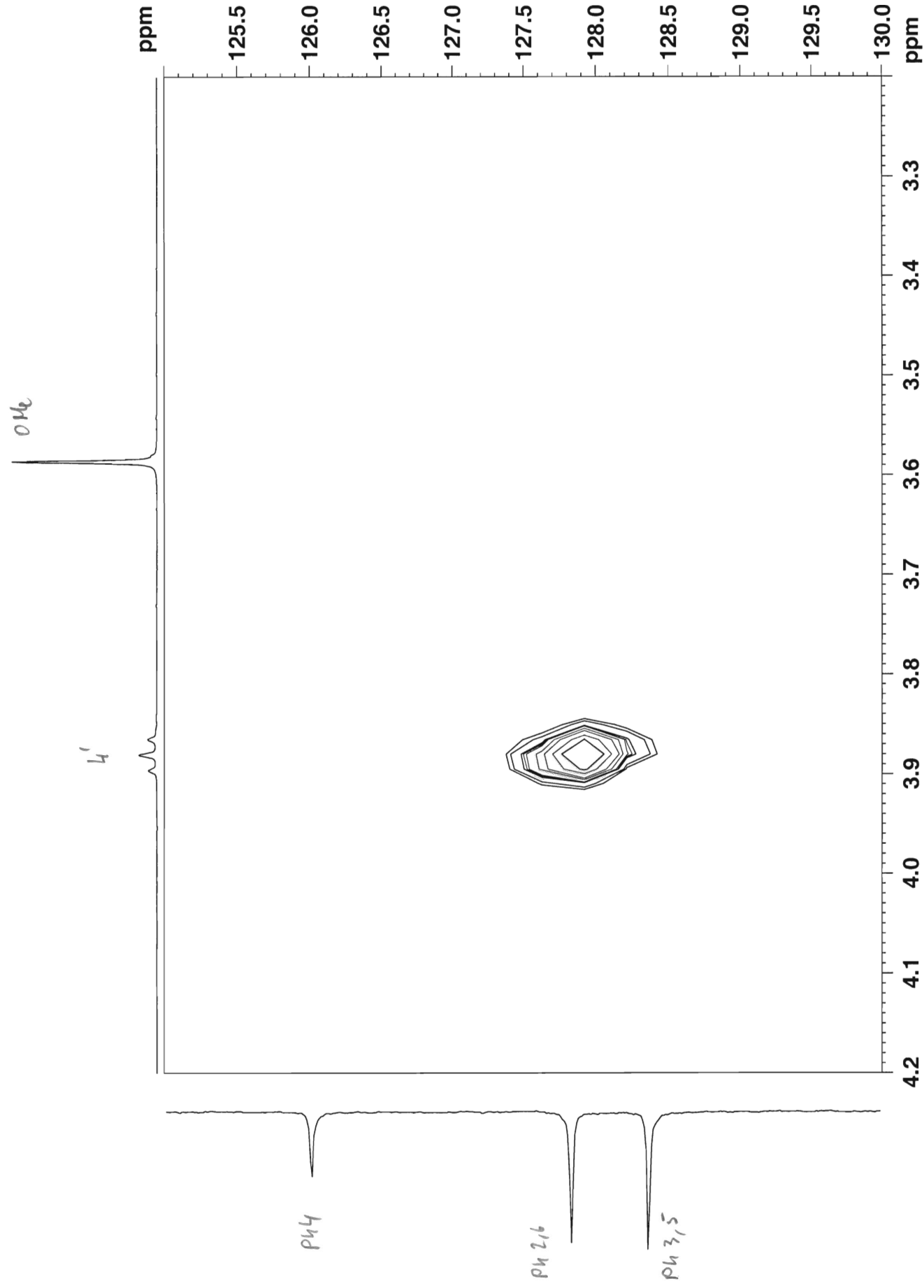
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



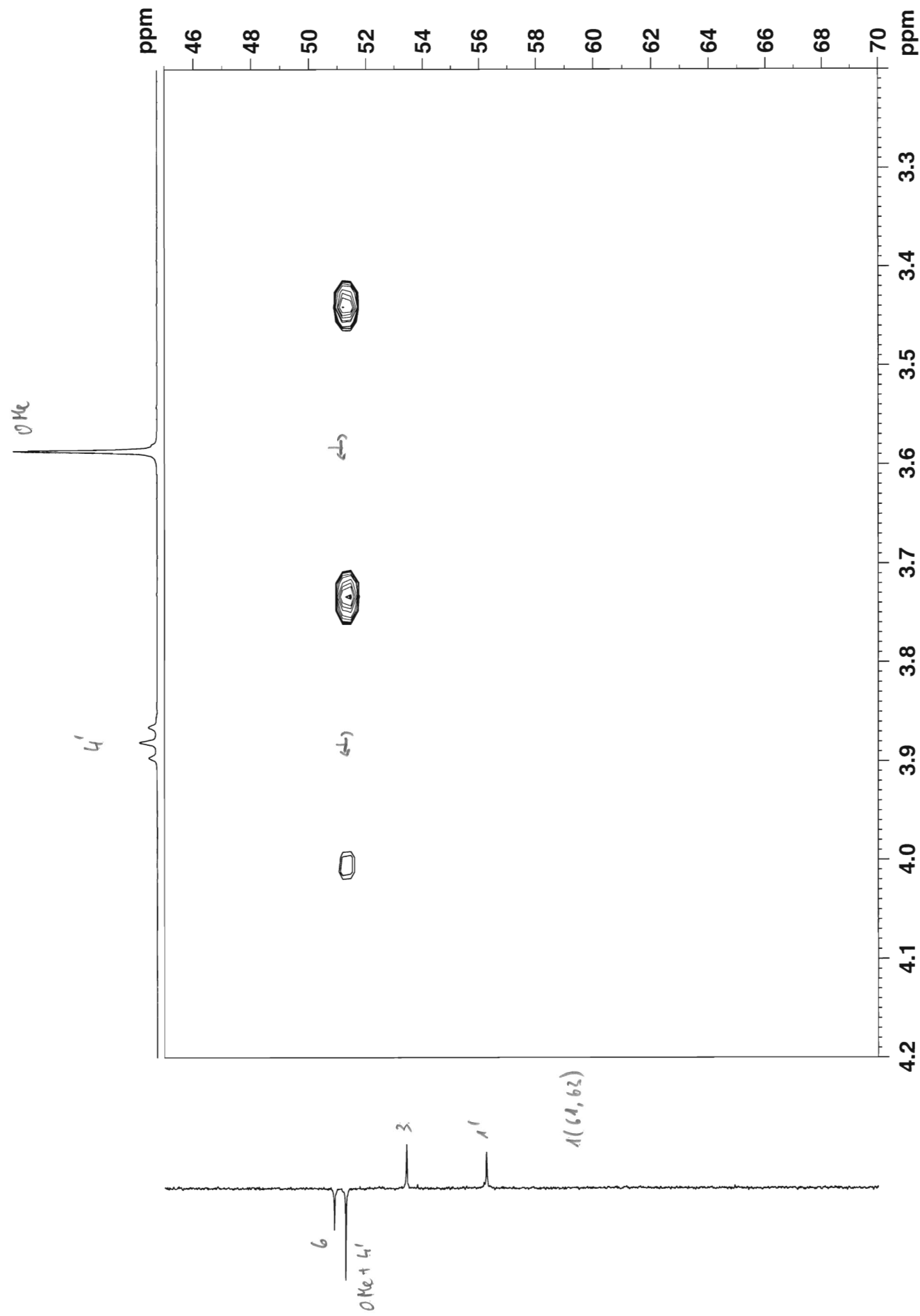
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



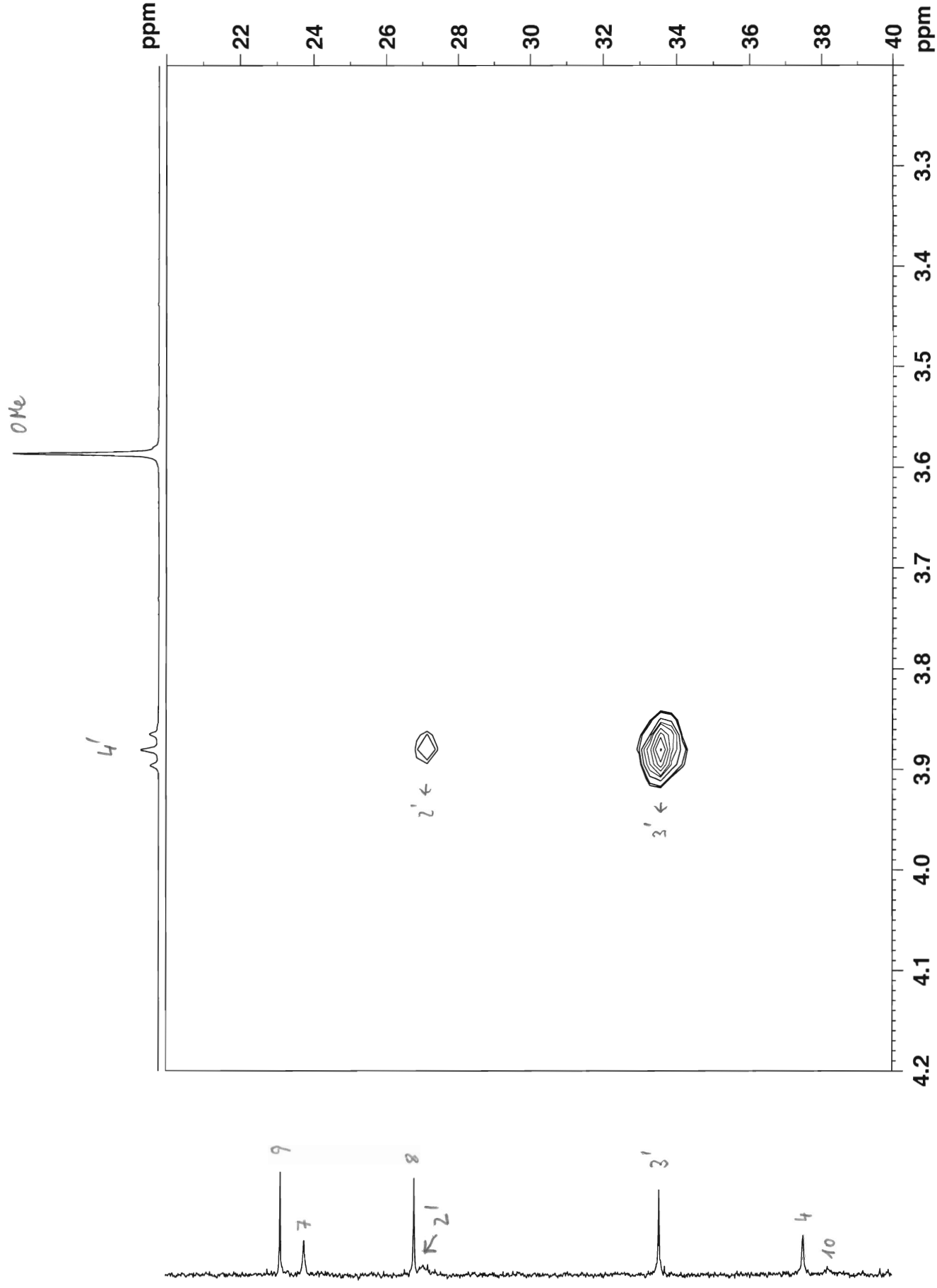
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011



GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011

7/1
9/14

7/2
9/2

11/2
3/2

1' 6

11/1 3/1

3'

4/1

10/1

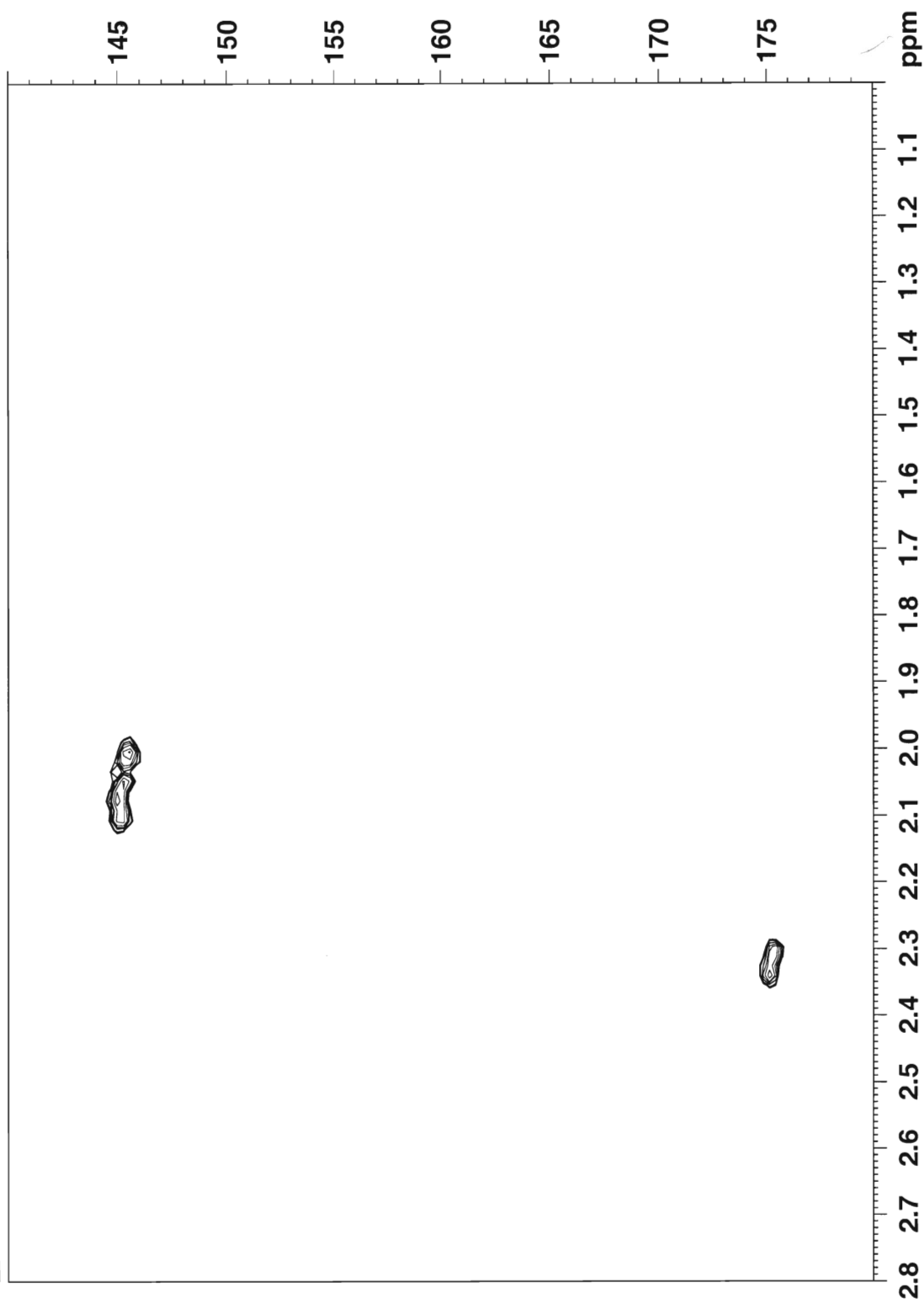
8/1

4/2

2'

10/2

ppm



Ph 1

Co 0

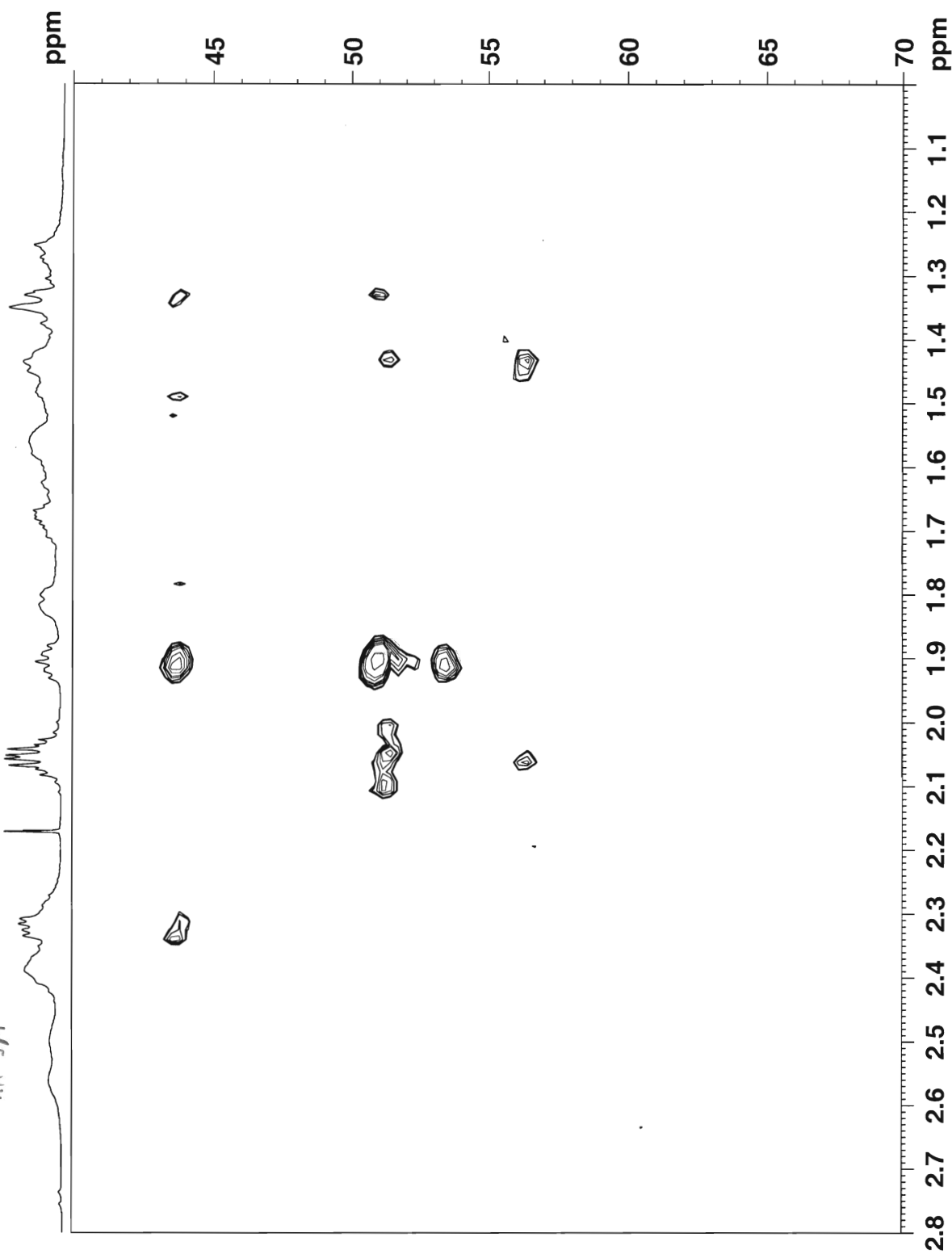
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011

7/4
9/4

7/2
9/2

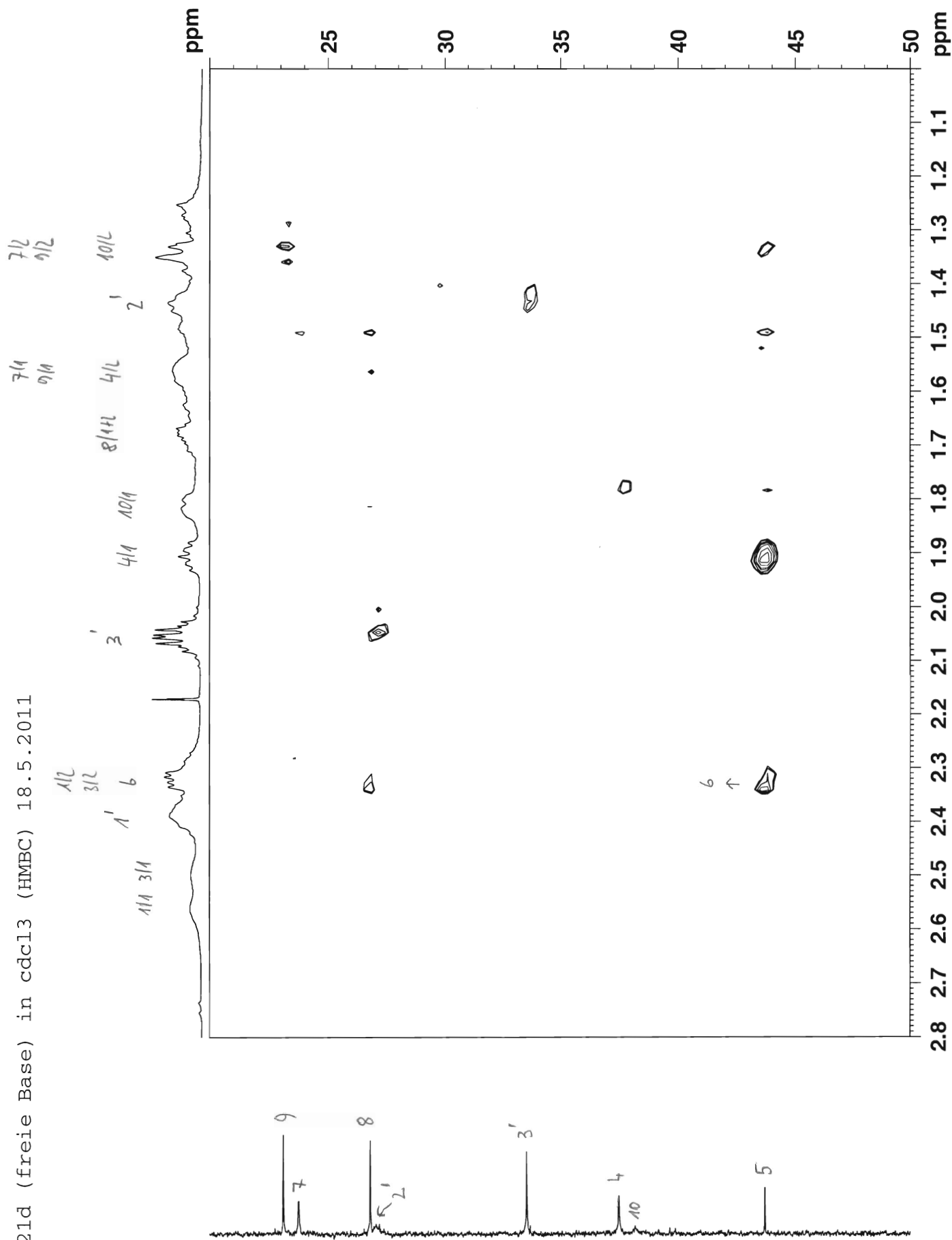
1/2
3/2

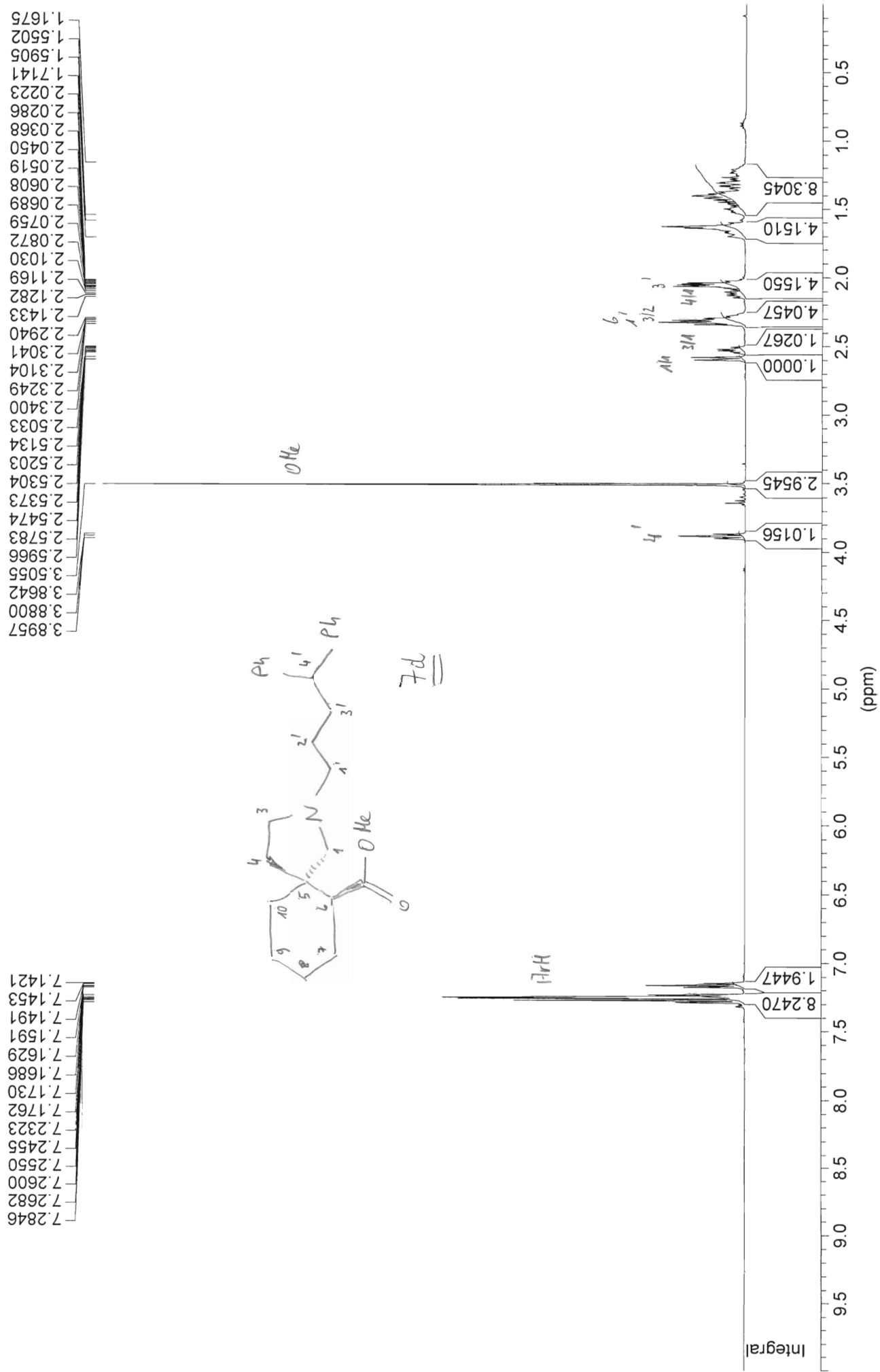
1H 3/1
1' 6
3' 3'
4/4 10/4 8/4+2 4/2 2' 10/2



4' + OH

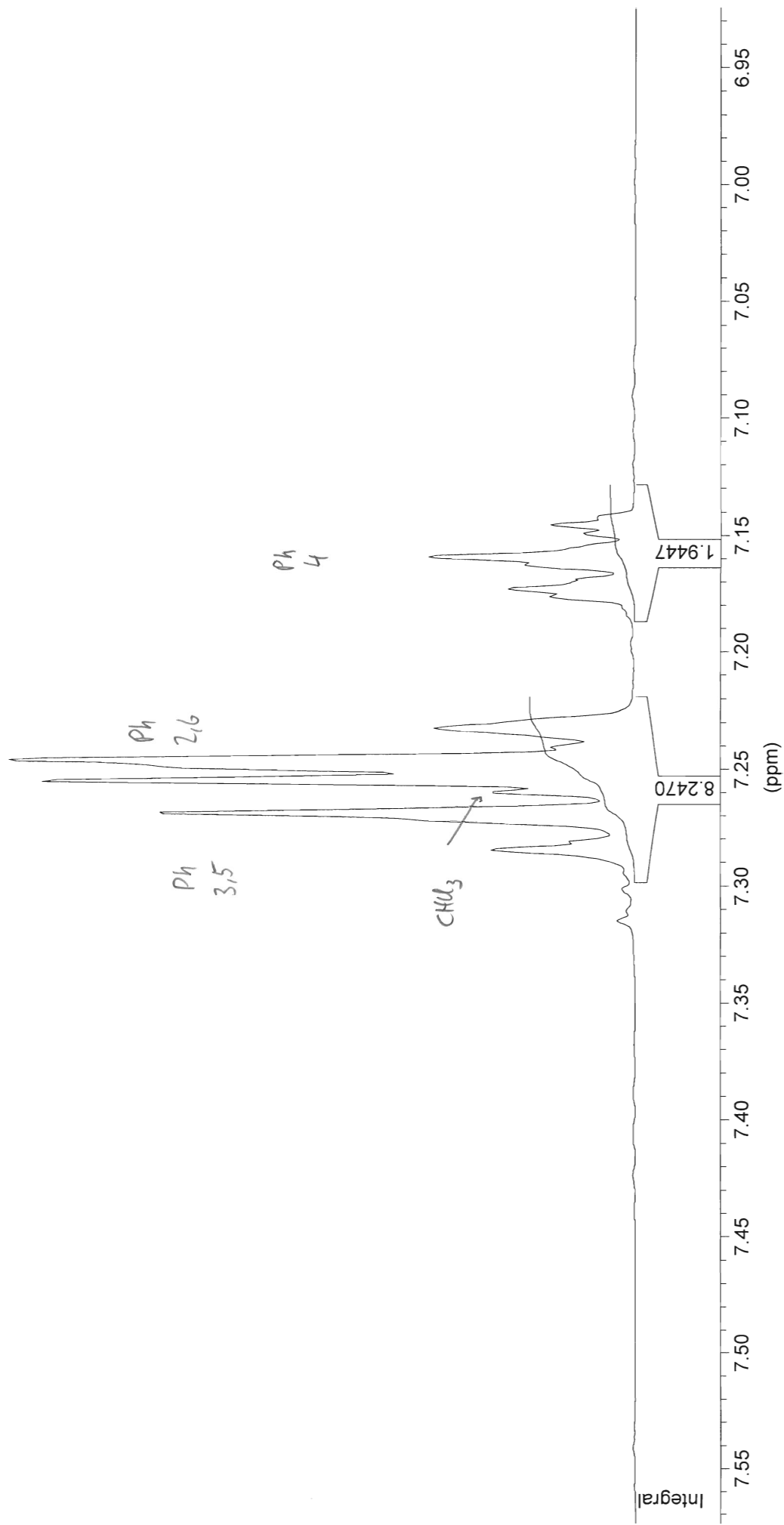
GABA 21d (freie Base) in cdcl3 (HMBC) 18.5.2011

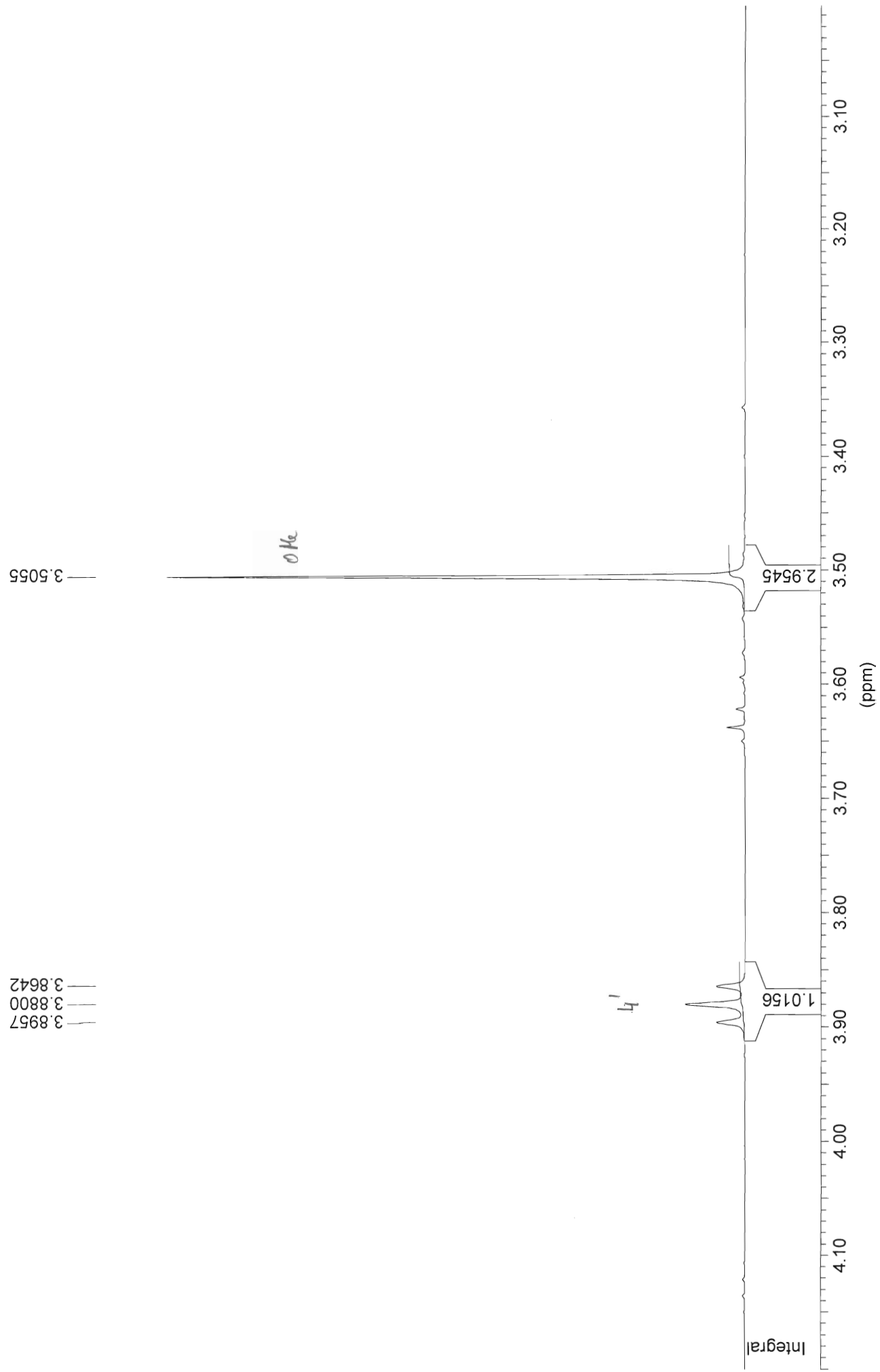


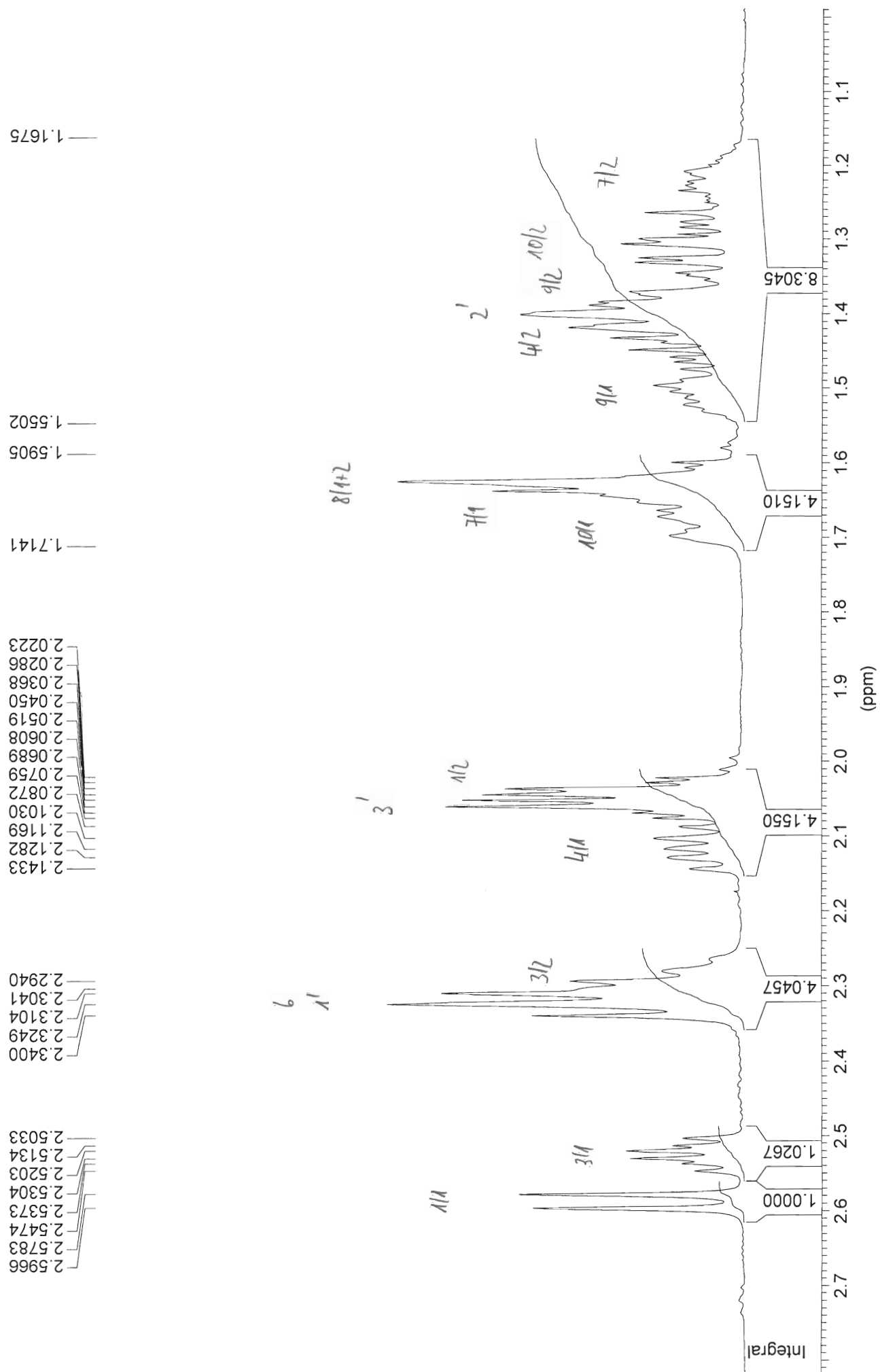


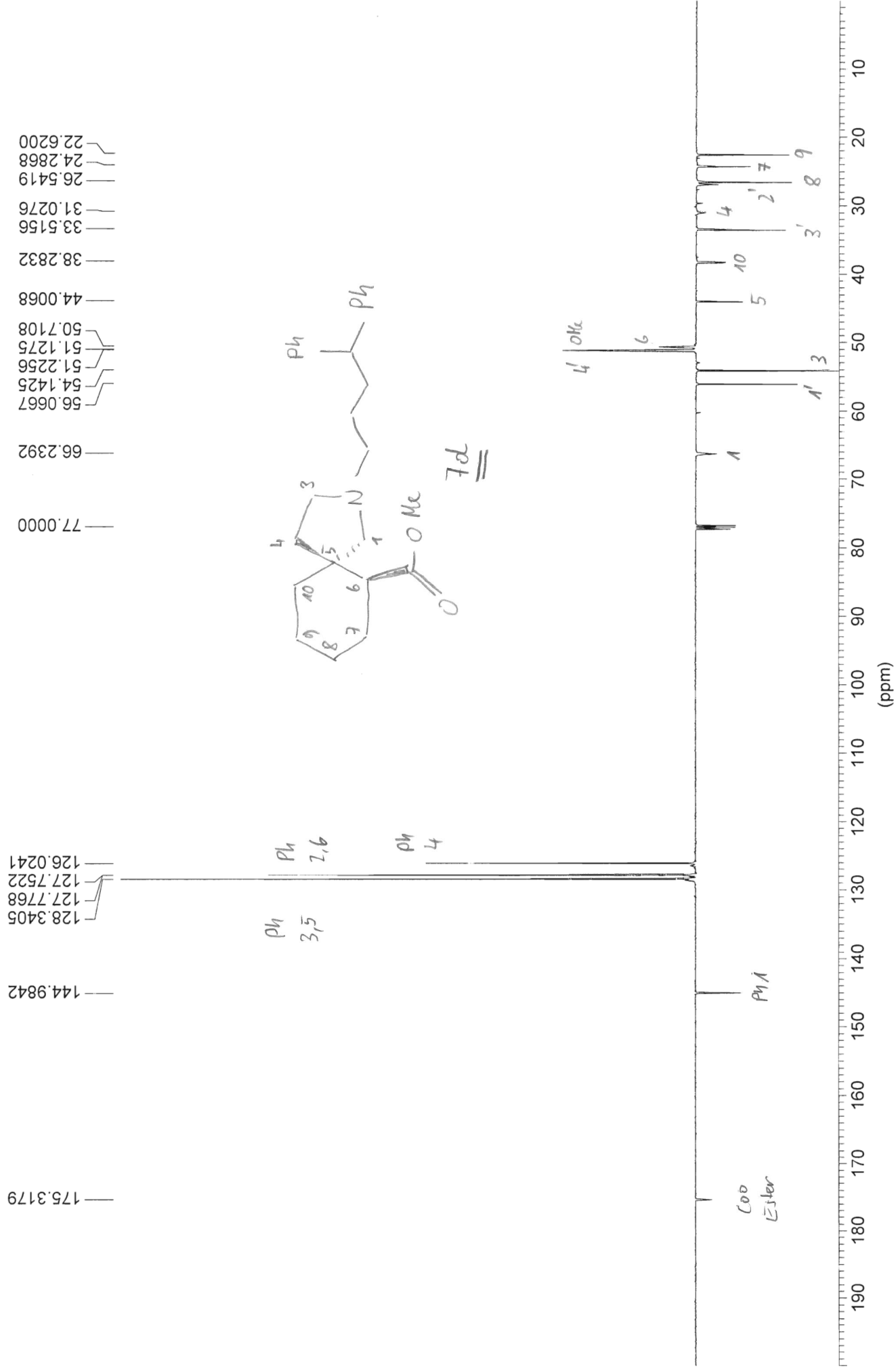
7.1762
7.1730
7.1686
7.1629
7.1591
7.1491
7.1453
7.1421

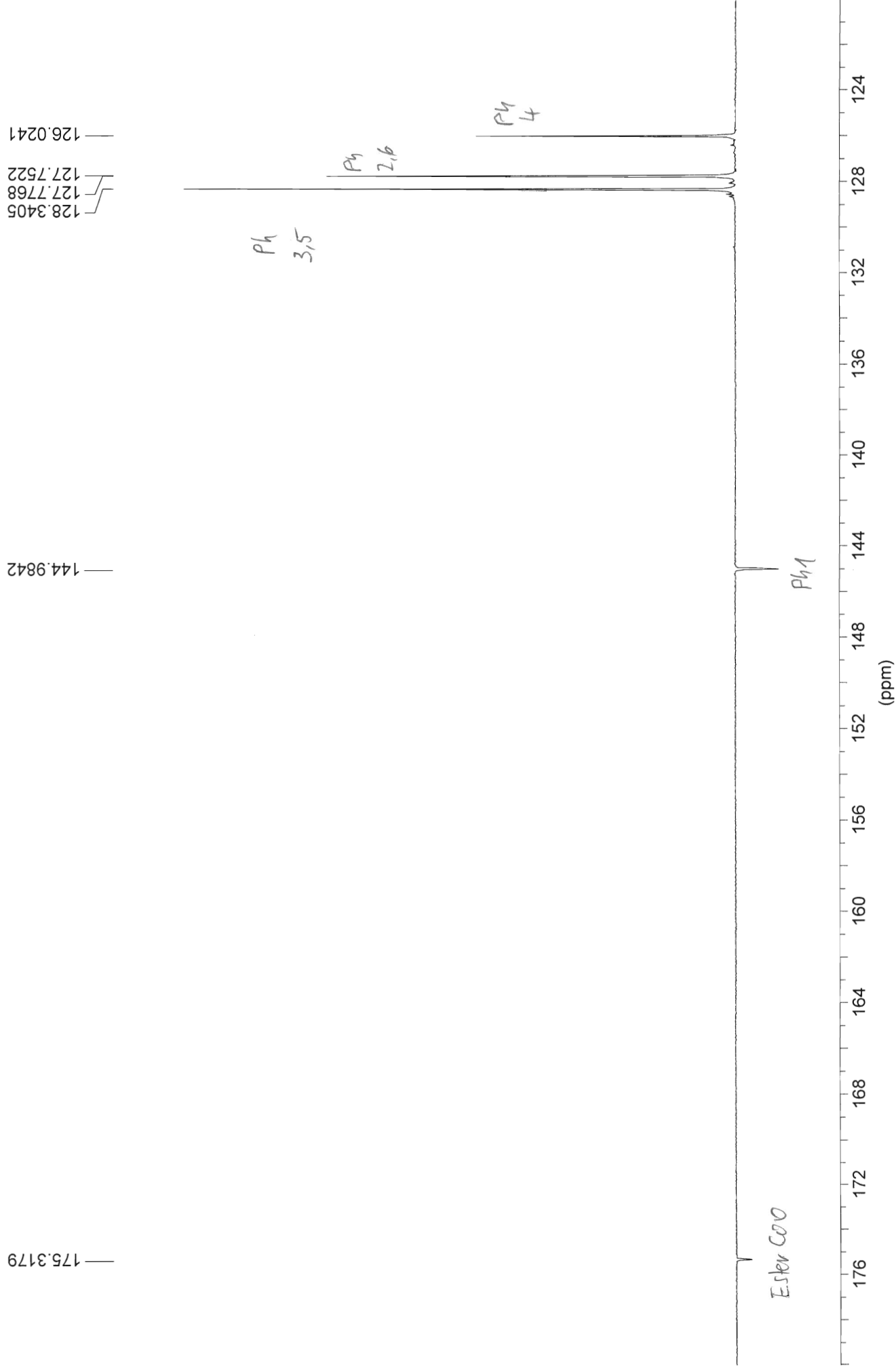
7.2846
7.2682
7.2600
7.2550
7.2455
7.2323

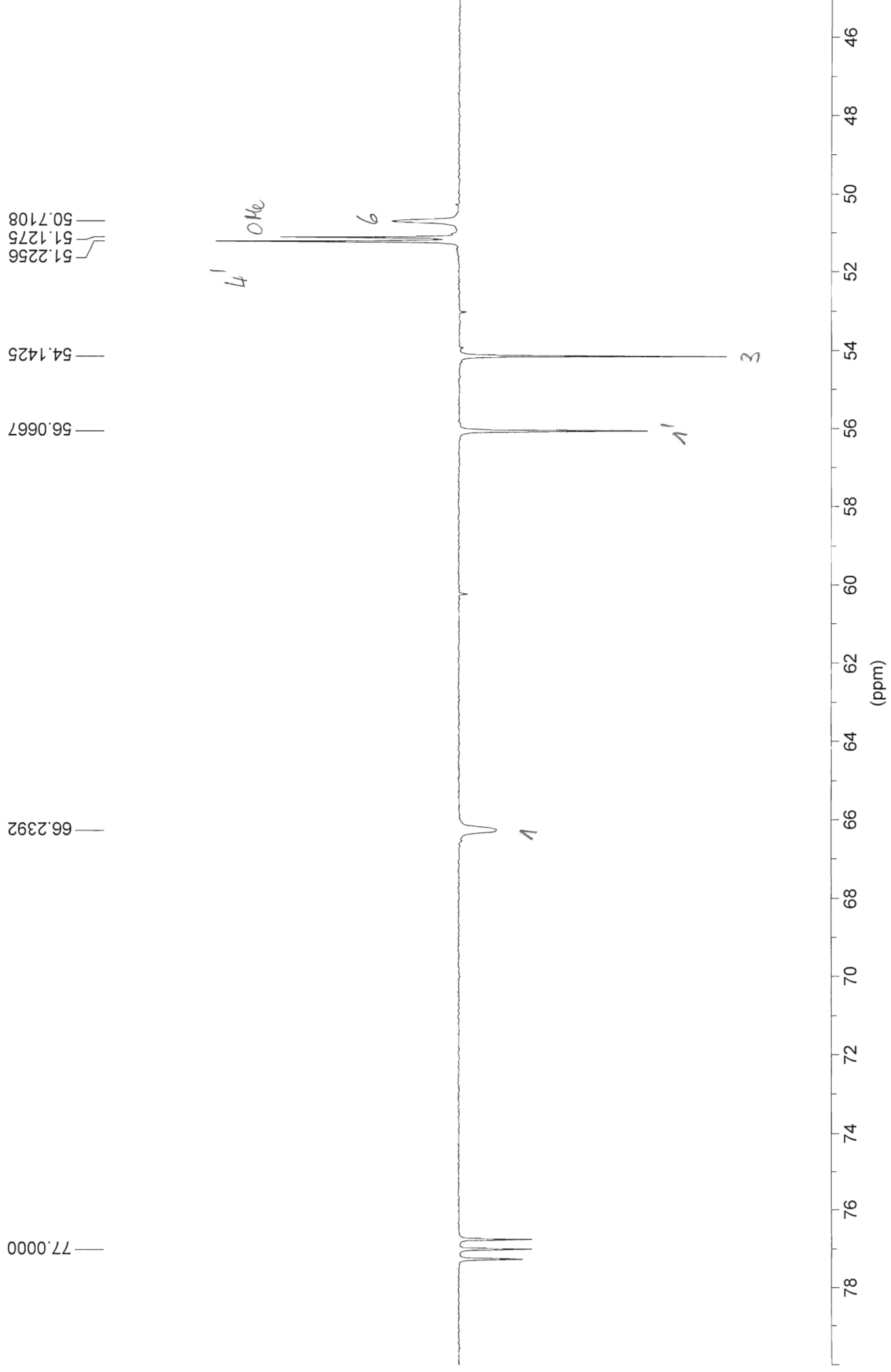


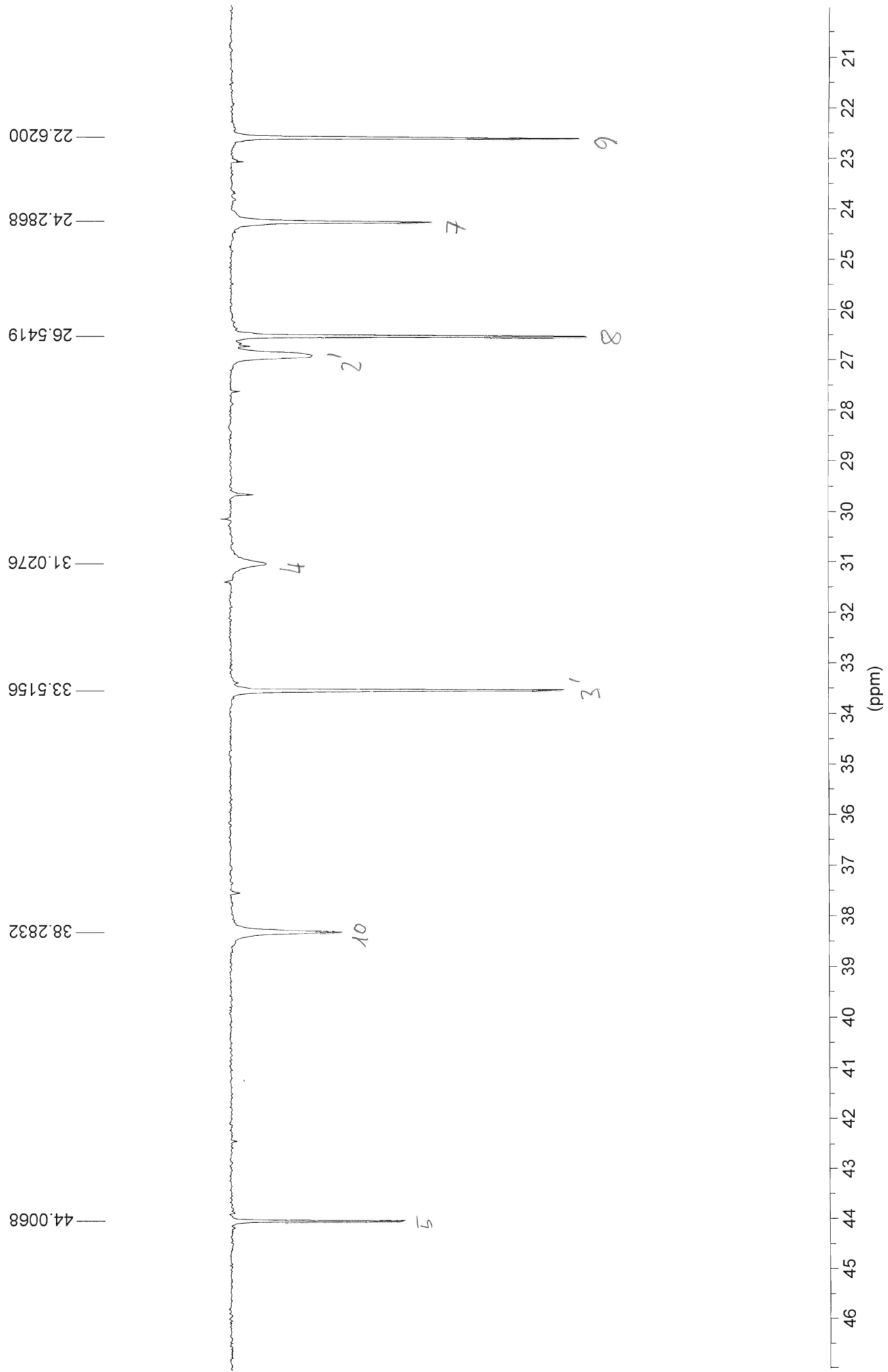




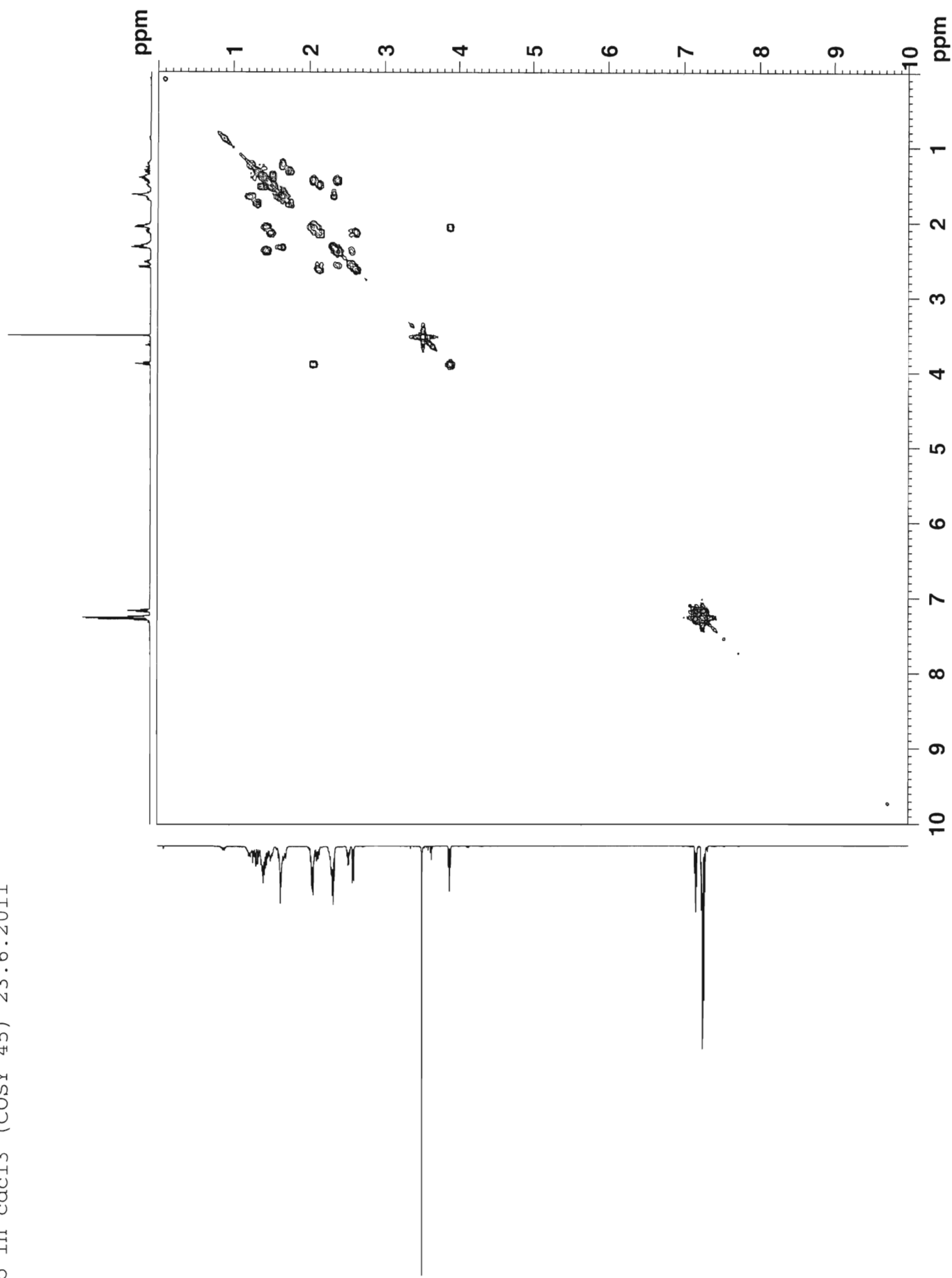


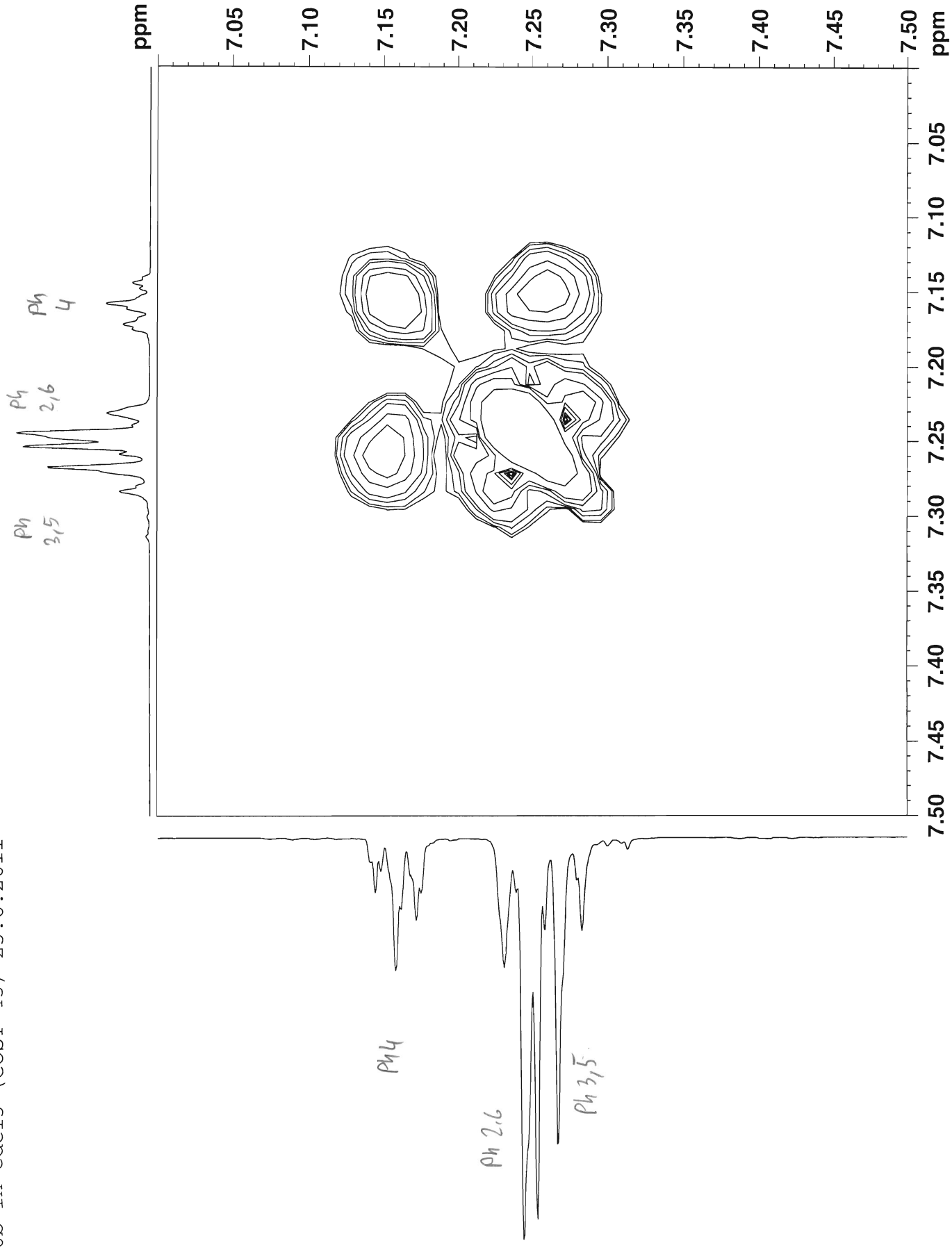


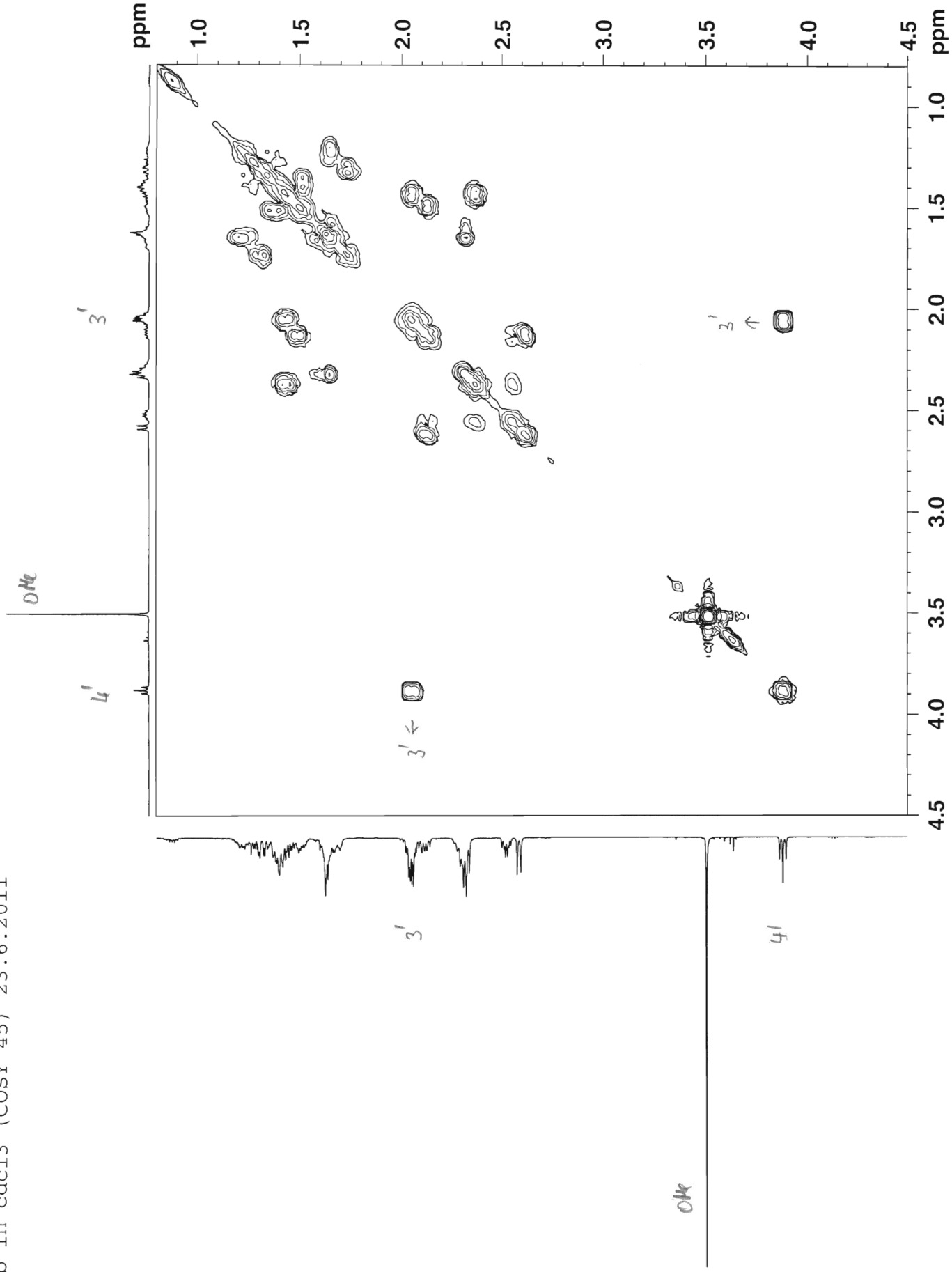


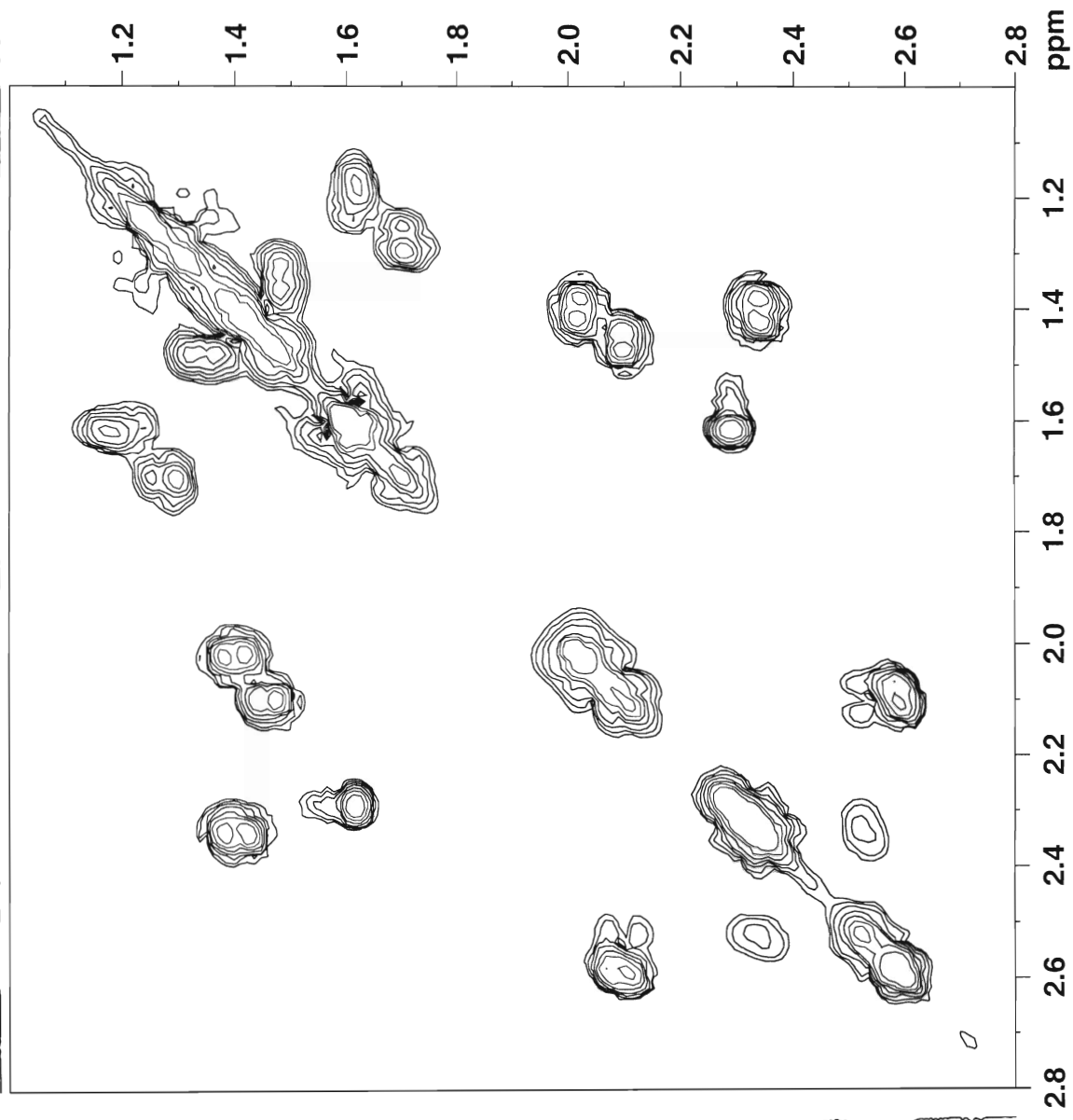


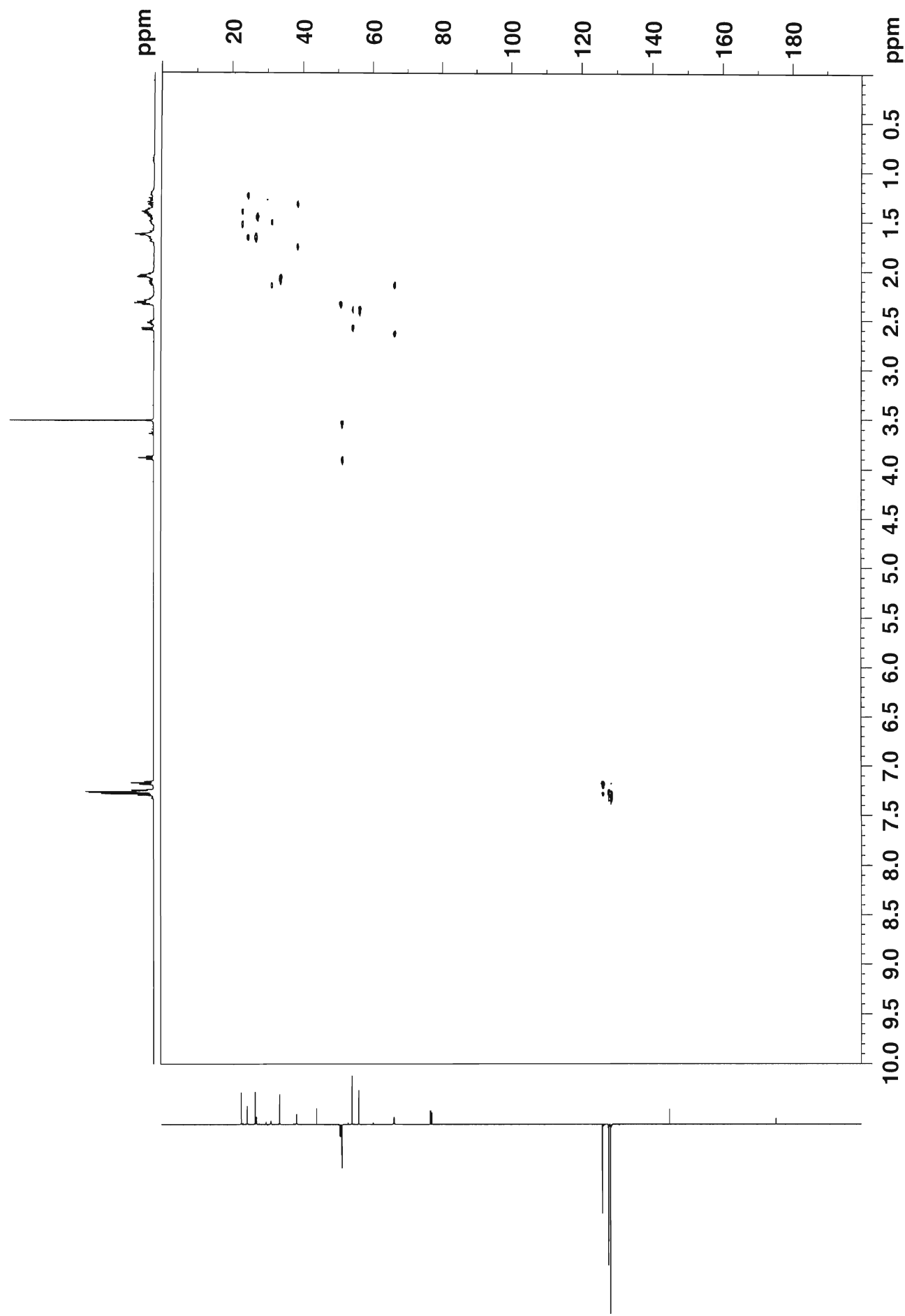
ha010b in cdcl3 (COSY 45) 23.6.2011



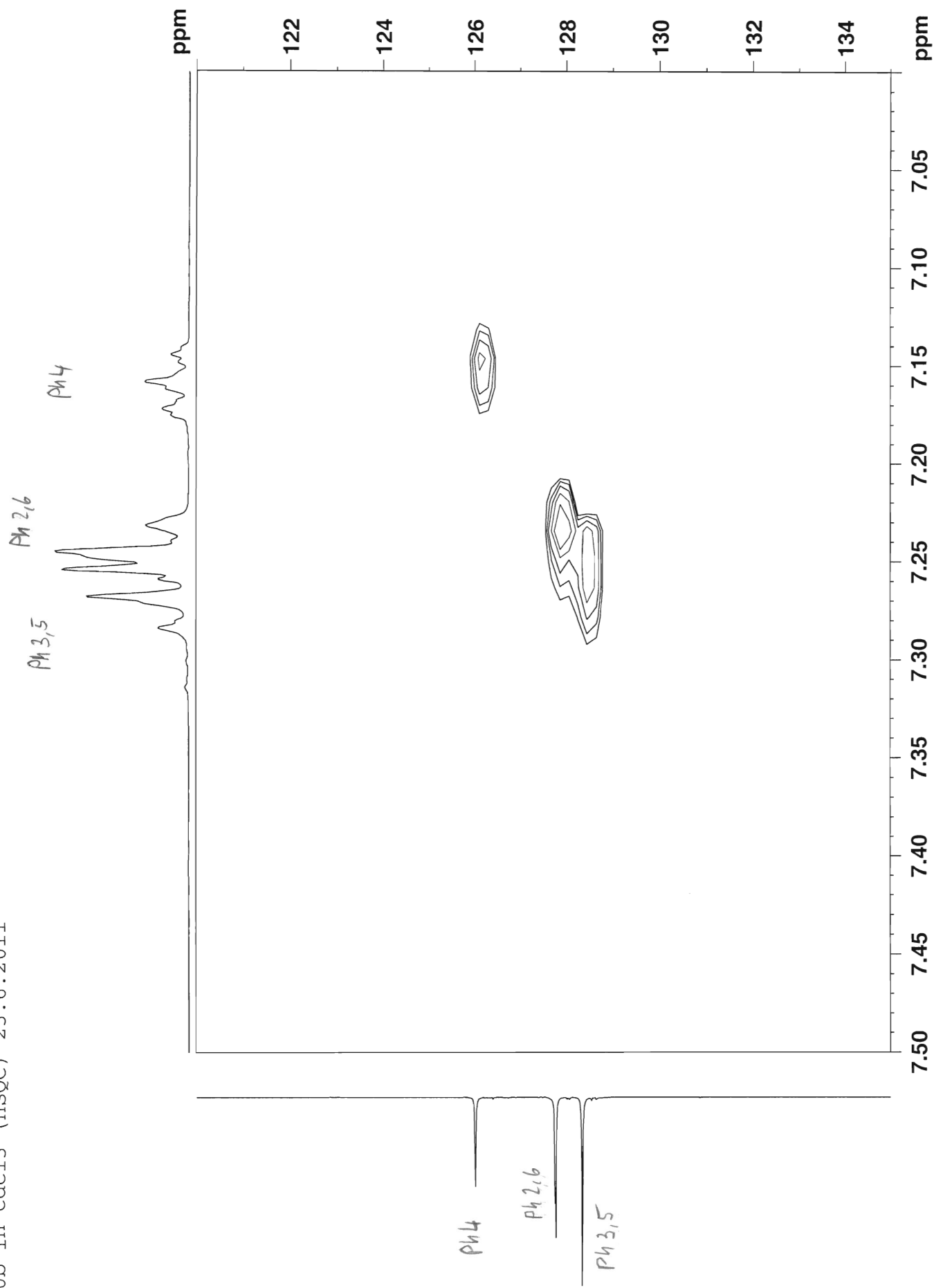




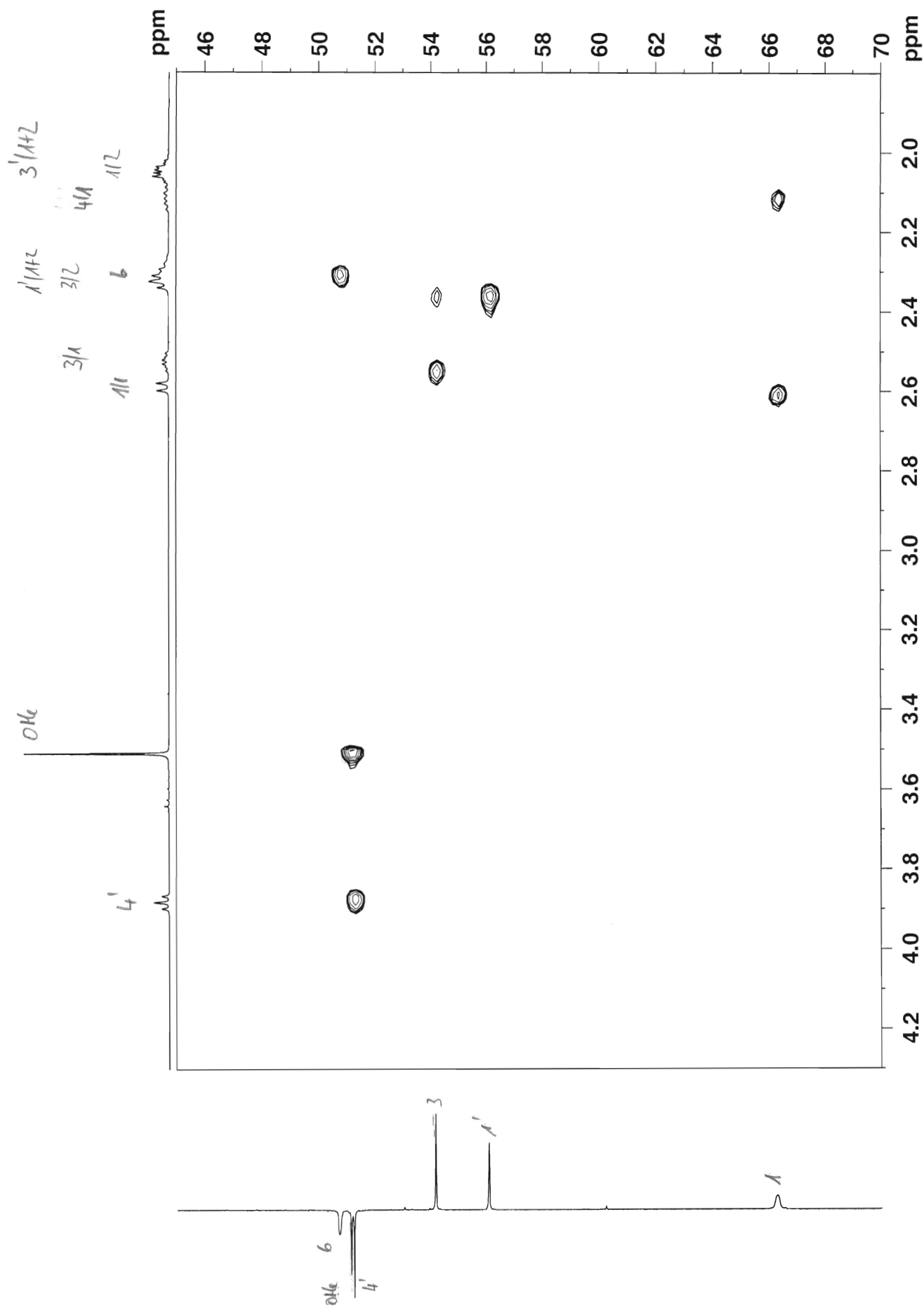




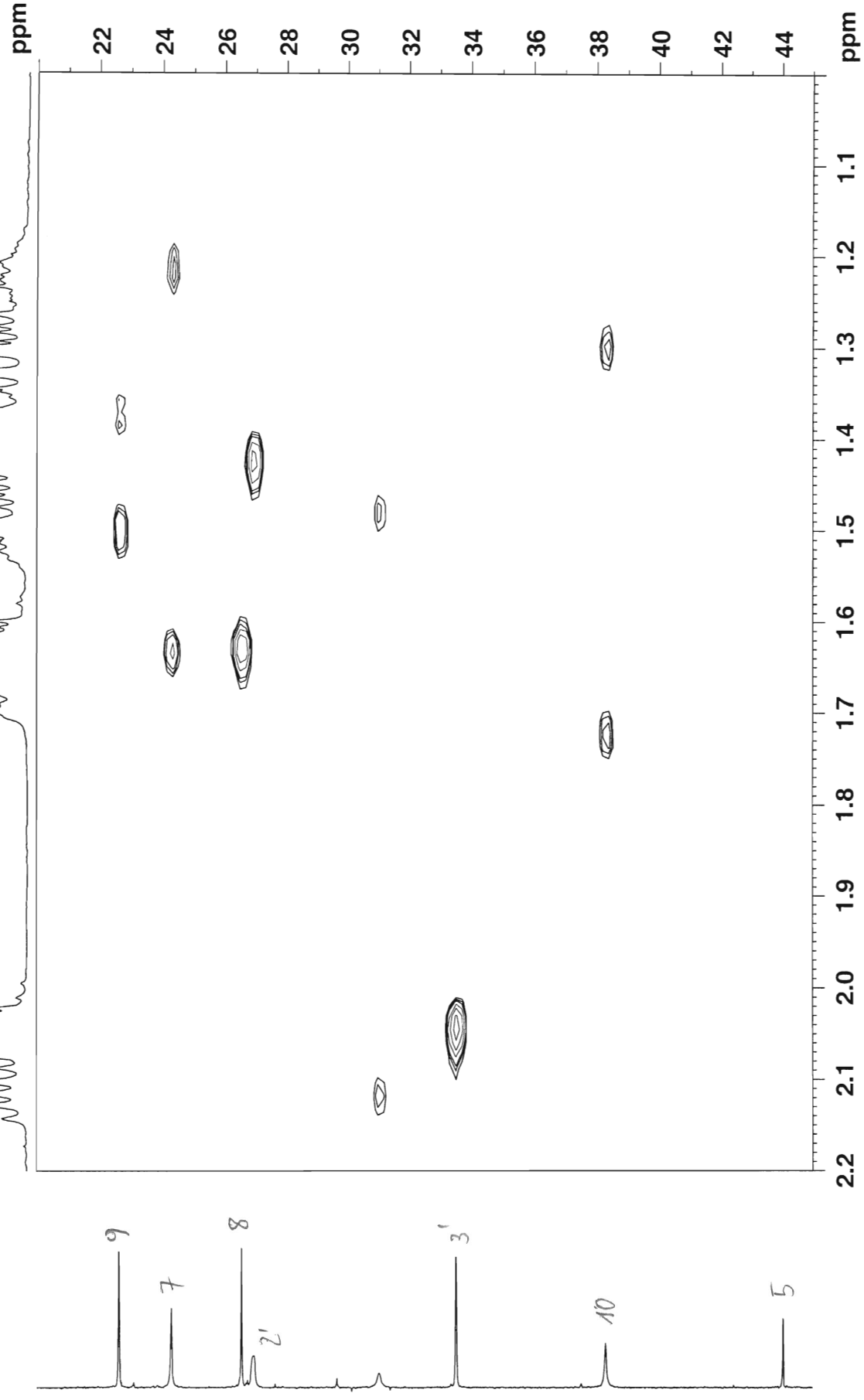
ha010b in cdcl3 (HSQC) 23.6.2011



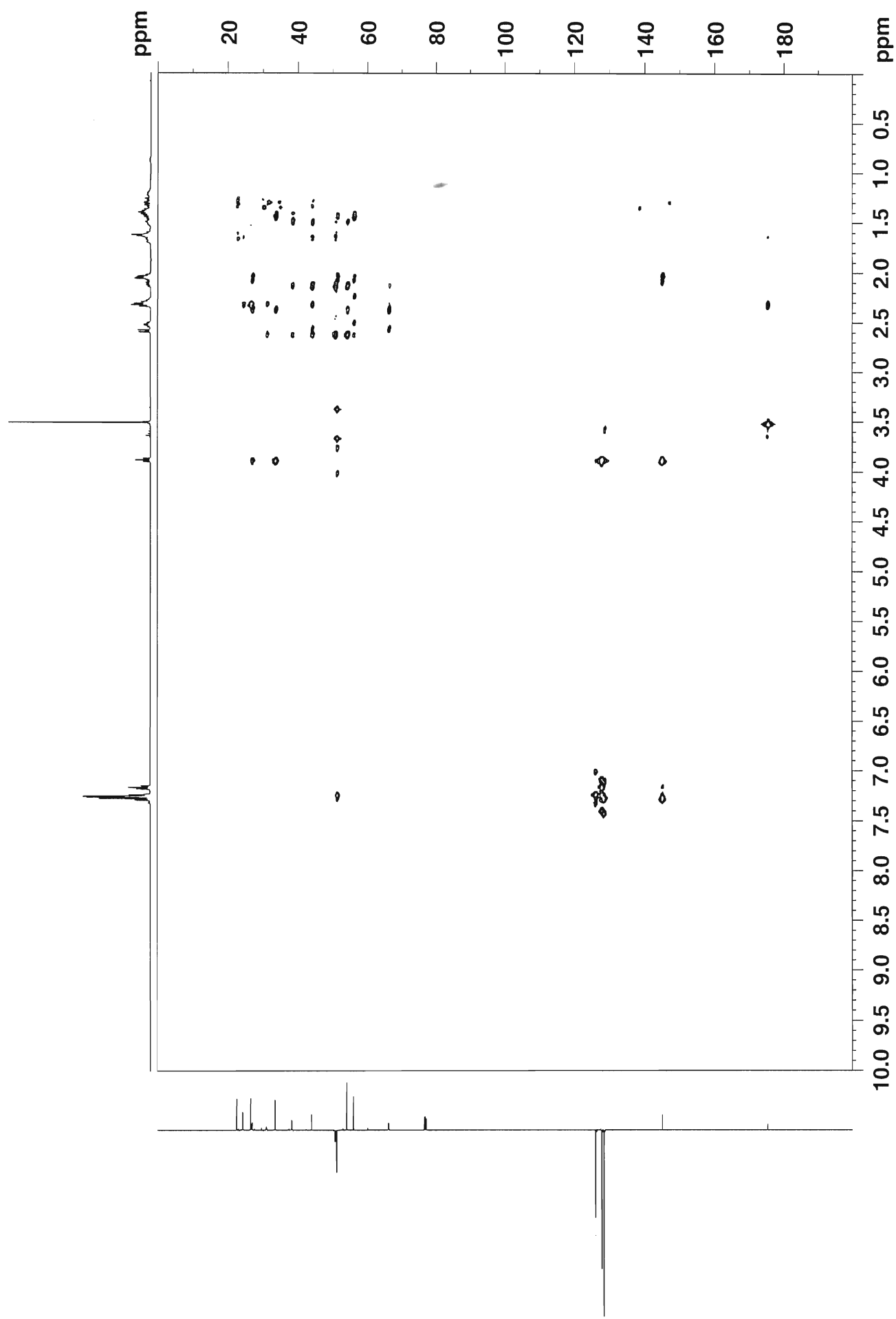
ha010b in cdcl3 (HSQC) 23.6.2011



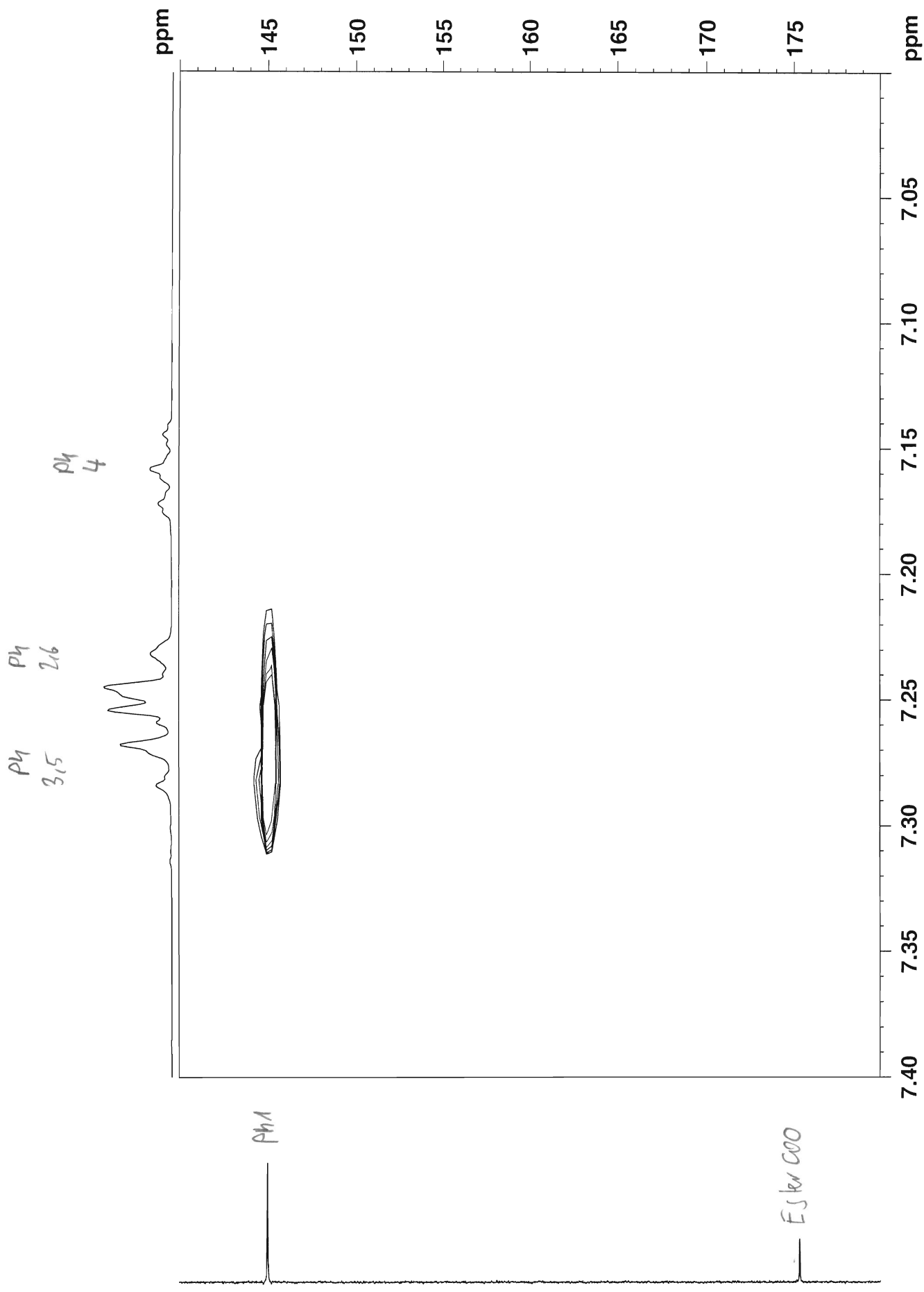
2+V18
V17

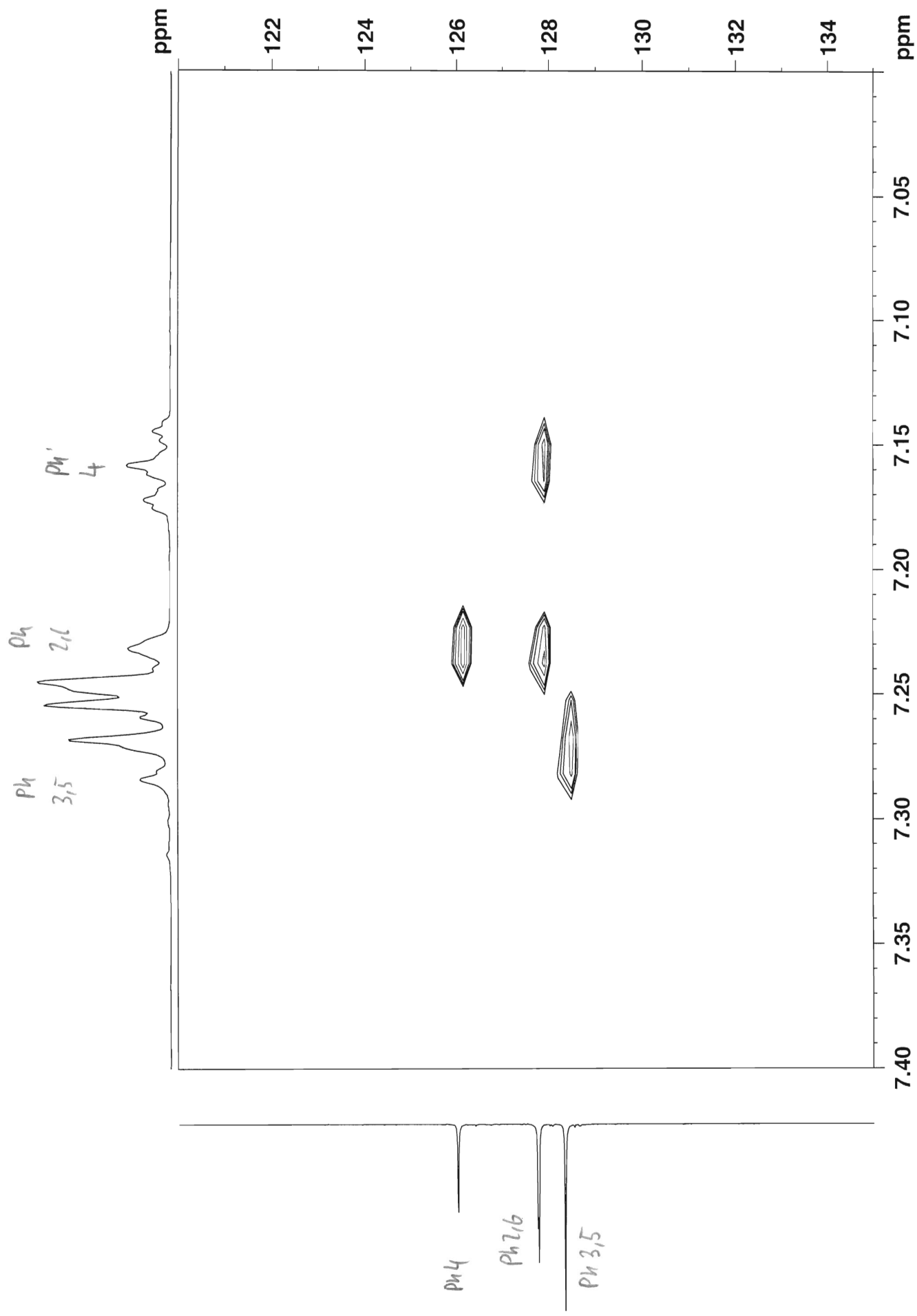


ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011

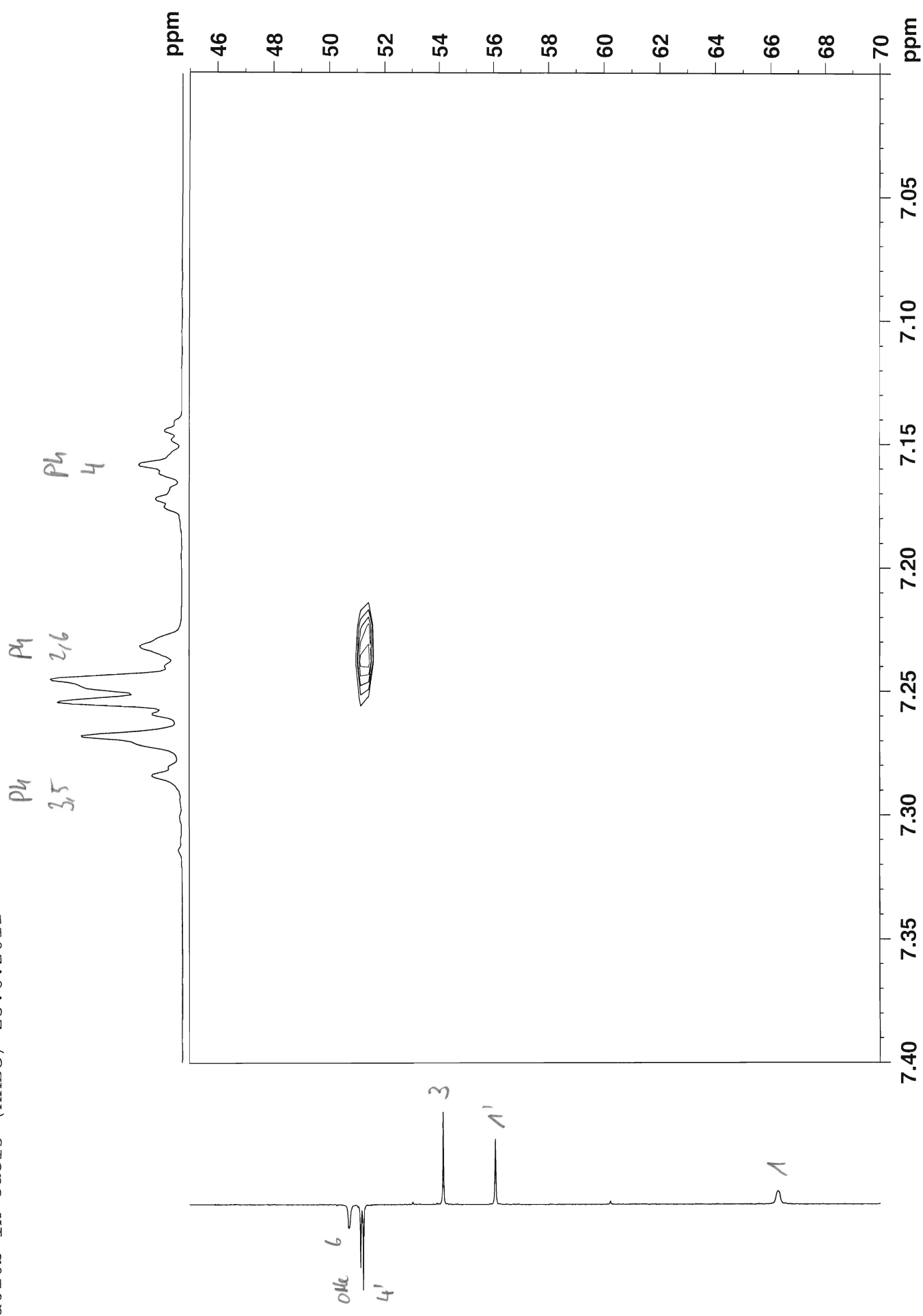


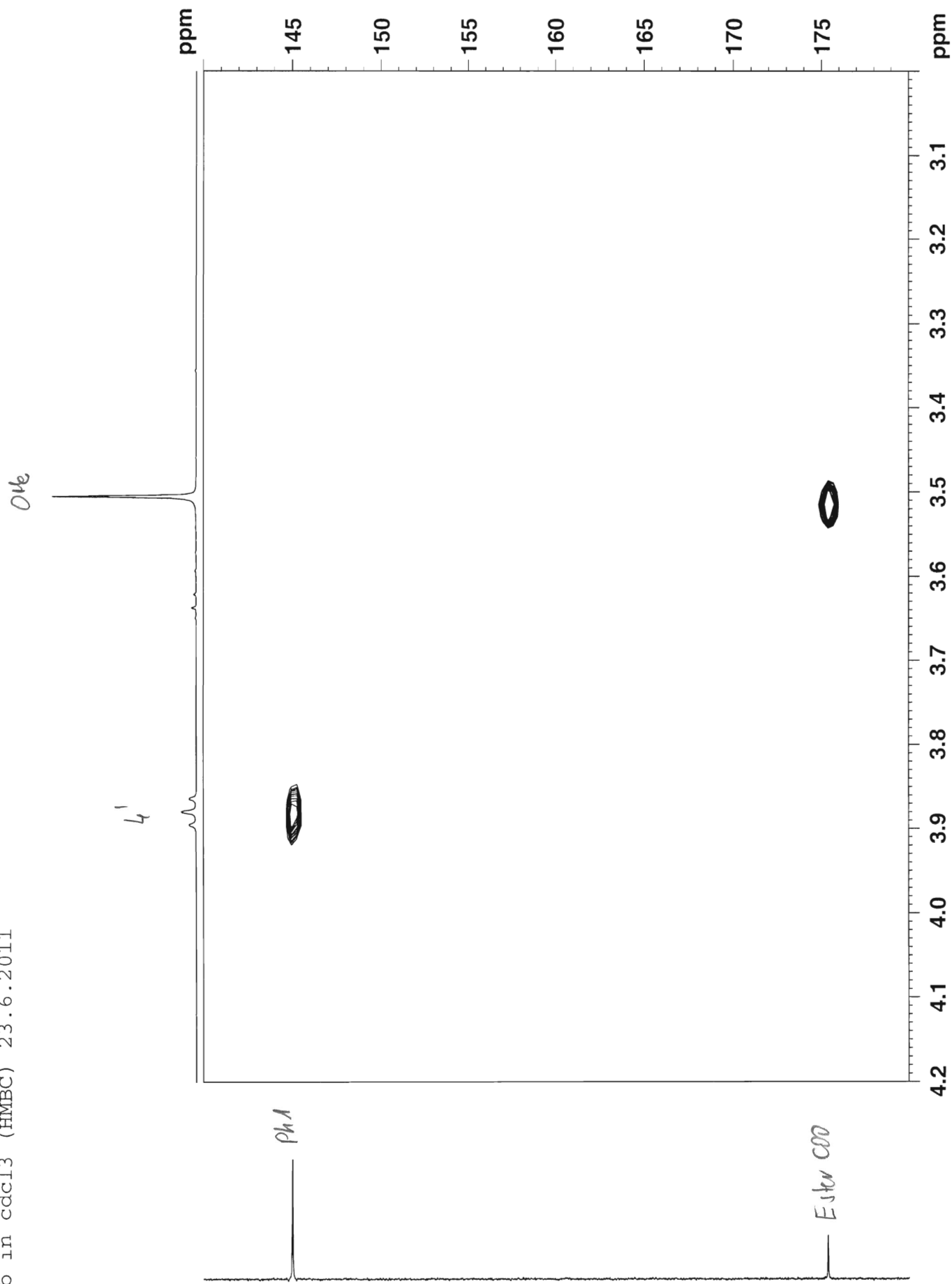
ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011





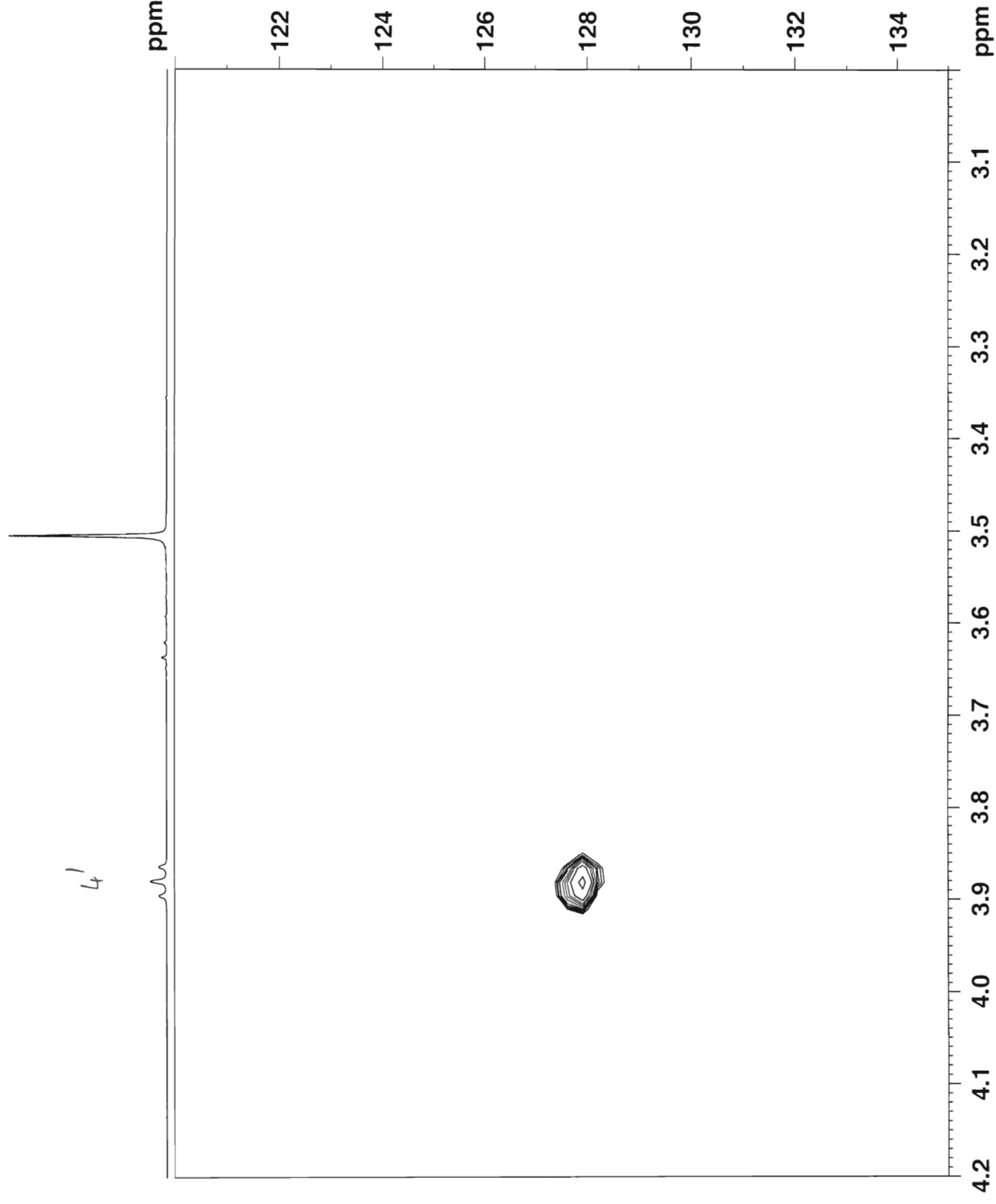
ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011



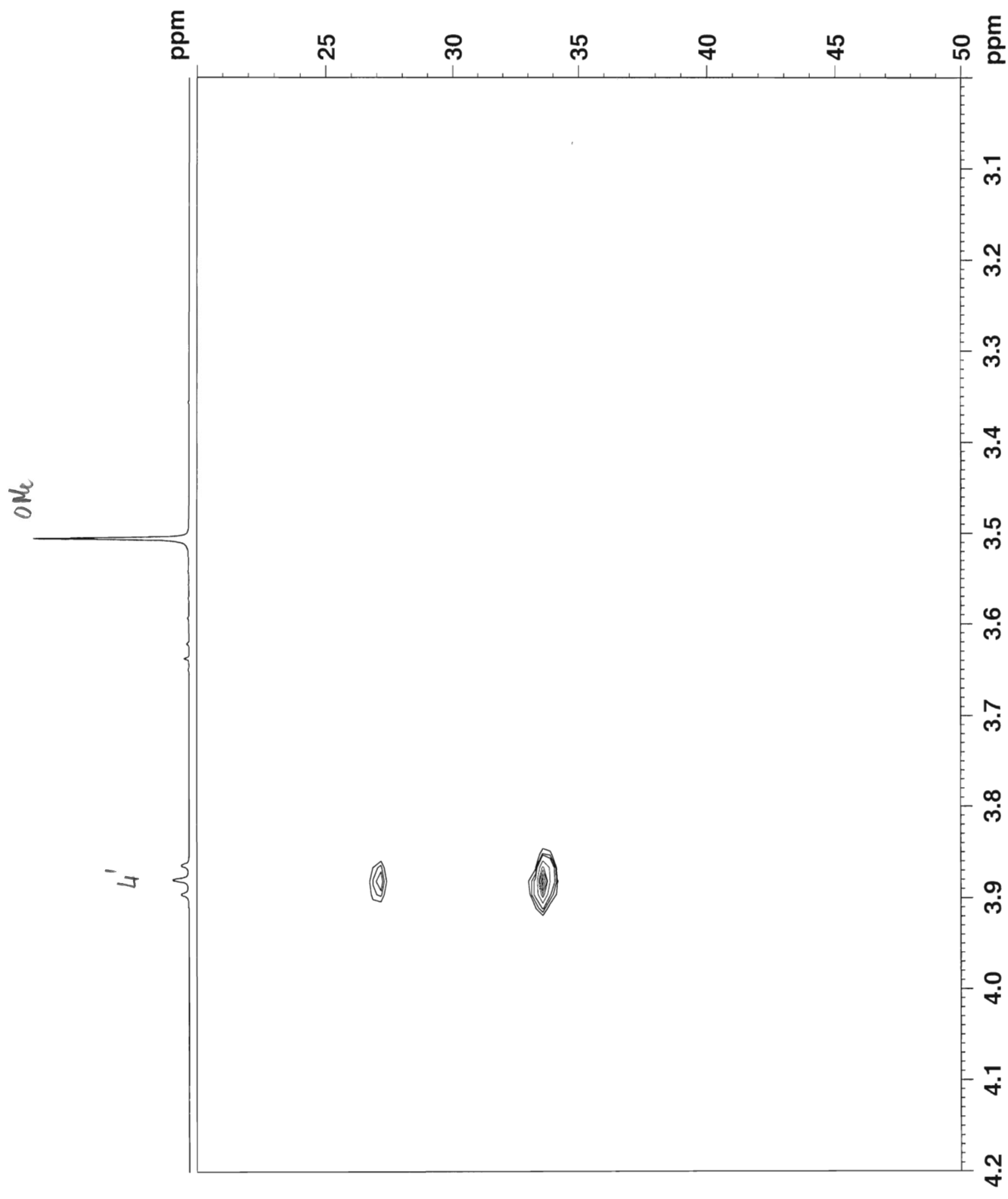


ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011

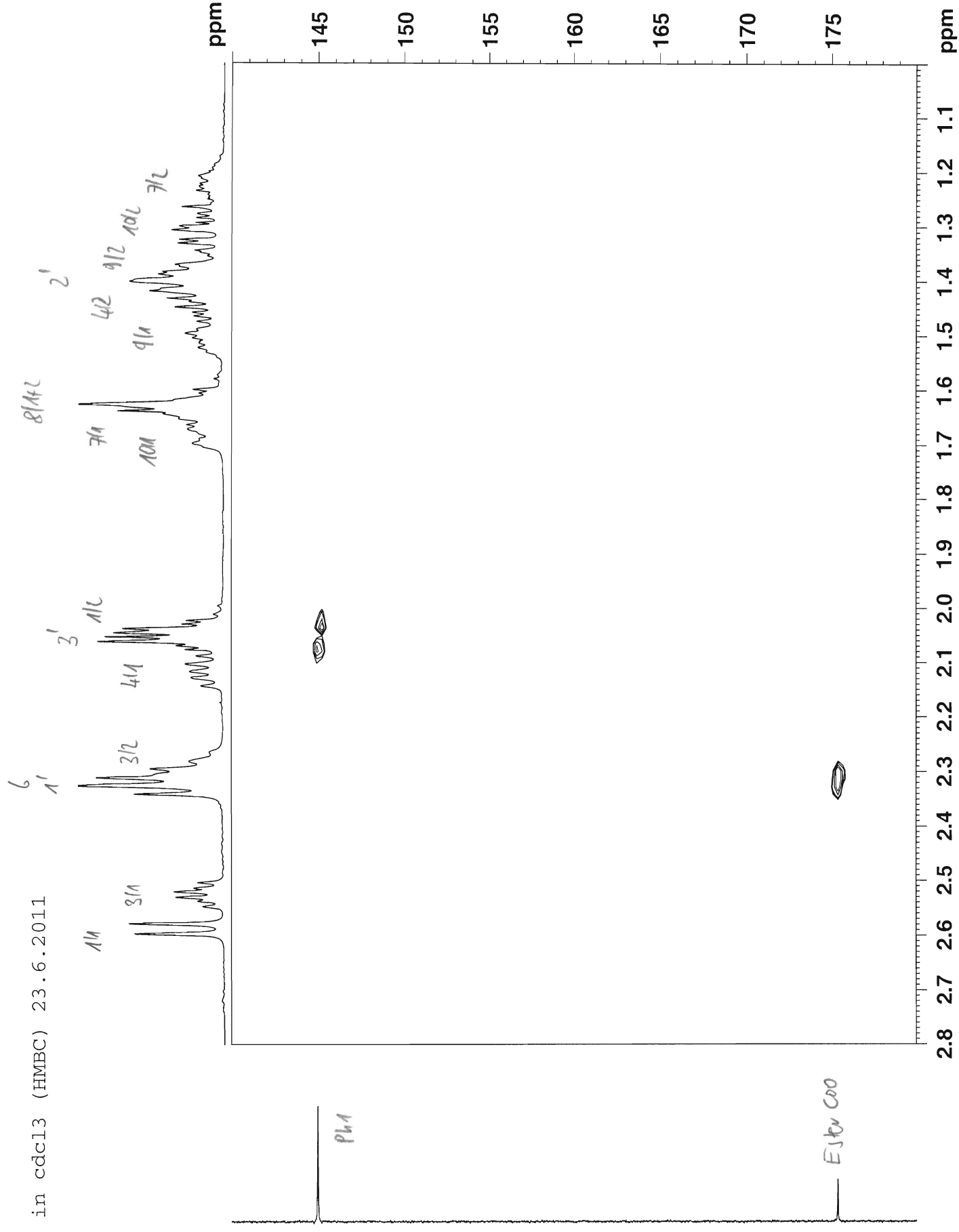
OMe



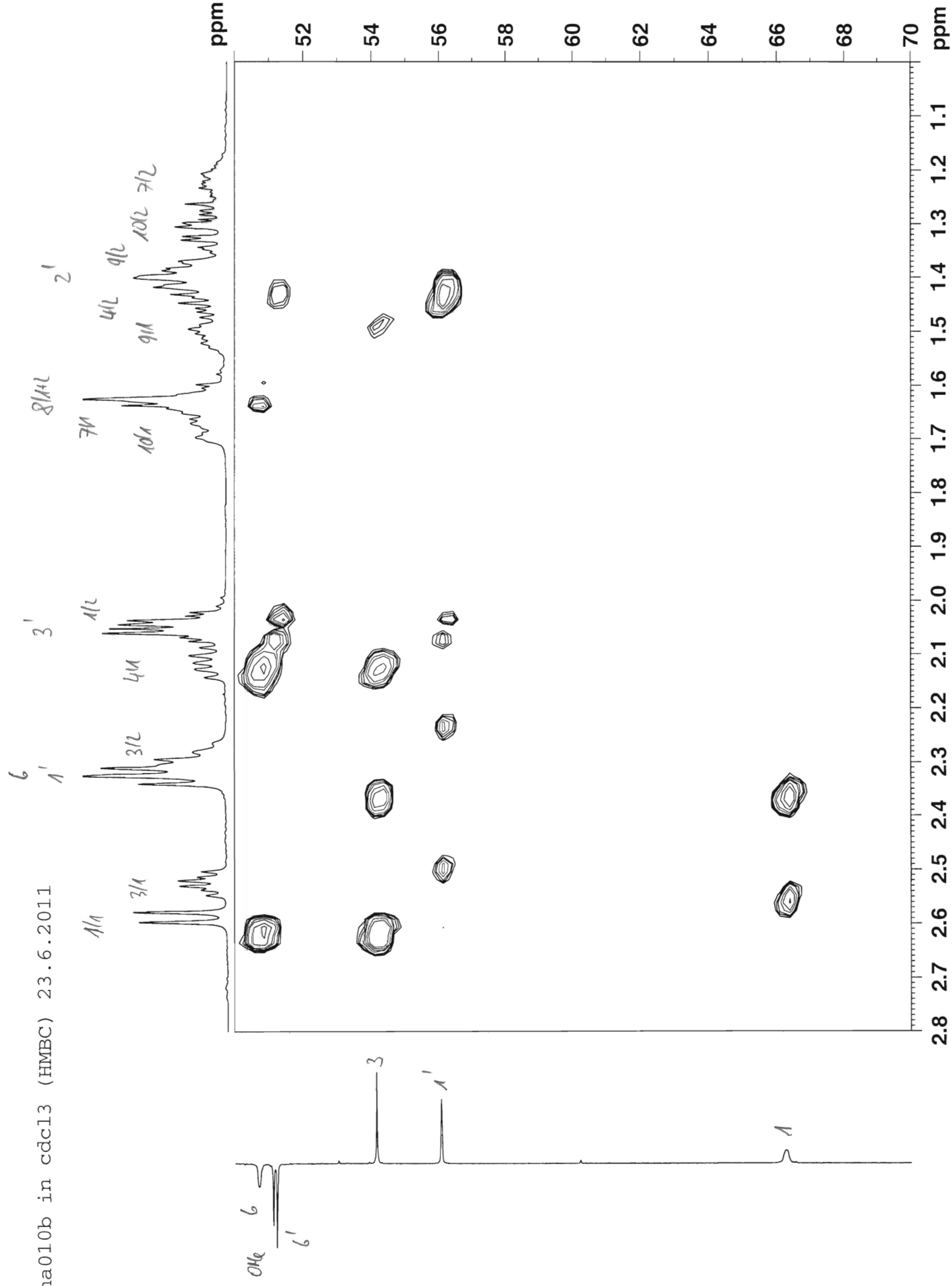
ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011

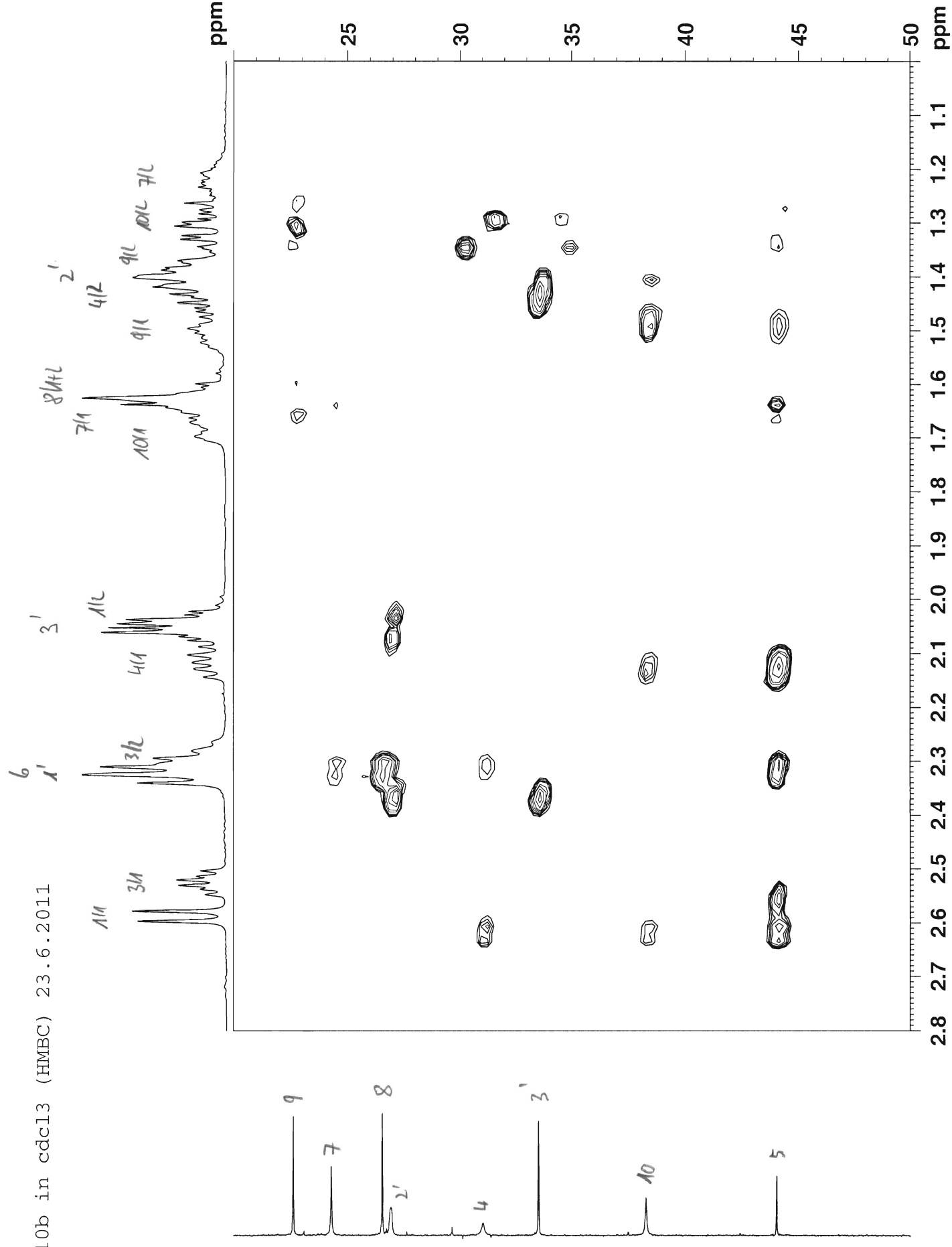


ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011



ha010b in cdcl3 (HMBC) 23.6.2011





Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Andrea Haumer
Geburtstag:	15.Juli.1988
Geburtsort:	Gmünd (Niederösterreich)
Eltern:	Josef und Maria Haumer
Geschwister:	Christian, Petra und Bernhard Haumer
Staatsangehörigkeit:	Österreich

Ausbildung

1994 – 1998	Volksschule Waldenstein
1998 – 2006	Gymnasium 3961 Gmünd
Juni 2006	Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
Seit Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien